

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA

Biotechnologie Mediche

Ciclo XX

Settore/i scientifico disciplinari di afferenza: BIO 10

TITOLO TESI:

*STUDIO DI BIOMATERIALI USATI COME SCAFFOLD PER TISSUE
ENGINEERING E LORO CARATTERIZZAZIONE CON TECNICHE
SPETTROSCOPICHE VIBRAZIONALI E DI ANALISI TERMICA.*

Presentata da: Dr. Michele Di Foggia

Coordinatore Dottorato
Prof.ssa Marialuisa Zerbini

Relatore
Prof. Concezio Fagnano

Esame finale anno 2008

Indice generale

INTRODUZIONE E SCOPO DELLA TESI.....	4
A - BIOMATERIALI.....	4
B - TISSUE ENGINEERING.....	6
I - Terminologia.....	8
II - Scaffold.....	9
a - Materiali per scaffold.....	10
1 - Ceramiche.....	10
2 - Polimeri.....	12
3 - Materiali compositi.....	16
III - Biomimetica ed interazioni superficiali	17
C - TECNICHE DI ANALISI.....	19
Bibliografia.....	20
METODICHE STRUMENTALI DI INDAGINE STRUTTURALE.....	22
A - TECNICHE SPETTROSCOPICHE VIBRAZIONALI.....	22
I - Spettroscopia IR.....	25
II - Spettroscopia Raman.....	29
B - TECNICHE DI ANALISI TERMICA.....	33
I - Termogravimetria TG.....	33
II - Calorimetria Differenziale a Scansione DSC.....	35
Bibliografia.....	38
PCL-PLLA.....	39
A - INTRODUZIONE.....	39
B - MATERIALI E METODI.....	40
I - Degradazione in vitro.....	42
II - Spettroscopia micro-Raman.....	42
III - Analisi termiche.....	44
C - RISULTATI E DISCUSSIONE.....	45
I - Degradazione in vitro: variazioni di peso.....	45
II - Analisi termiche.....	46
III - Analisi micro-Raman.....	47
a - fibre di PLLA.....	47
b – matrice di PCL.....	51
D - CONCLUSIONI.....	54
Bibliografia.....	55
PCL-HA.....	58
A - INTRODUZIONE.....	58
B – MATERIALI E METODI.....	59
I – Sintesi dei compositi.....	59
II – Degradazione e variazioni di peso dei campioni.....	60
III – Analisi spettroscopiche.....	61
IV – Analisi termiche.....	61
V - Irraggiamento.....	63
C – RISULTATI E DISCUSSIONE.....	63
I - PCL e PCL/HA non degradati.....	63
II – Degradazione del PCL puro.....	67

III – Degradazione dei campioni compositi PCL/HA.....	69
IV – Mineralizzazione dei campioni compositi PCL/HA.....	73
V – Test di coltura cellulare: dati termici e FT-Raman.....	75
VI - Campioni irraggiati con raggi- γ a 50 kGy.....	76
D – CONCLUSIONI.....	78
Bibliografia.....	79
PEPTIDI AUTOASSEMBLANTI.....	83
A – INTRODUZIONE.....	83
B – MATERIALI E METODI.....	85
C – RISULTATI E DISCUSSIONE.....	91
I – Peptidi appena sintetizzati.....	91
II– Peptidi dopo solubilizzazione e liofilizzazione.....	97
D - CONCLUSIONI.....	102
Bibliografia.....	102
CONCLUSIONI.....	105

INTRODUZIONE E SCOPO DELLA TESI

A - BIOMATERIALI

Ogni anno, migliaia di interventi chirurgici richiedono sostituti di organi e tessuti per riparare o sostituire organi e tessuti danneggiati o ammalati. Per rispondere a queste esigenze, uno dei campi della ricerca medica che ha introdotto le maggiori innovazioni negli ultimi decenni è senza dubbio quello dei biomateriali, in particolare nelle applicazioni ortopediche e dentarie. I requisiti fondamentali di ogni biomateriale sono: la compatibilità con i tessuti umani e il possedere tutte quelle caratteristiche fisiche, chimiche e biologiche che consentano al materiale di svolgere adeguatamente il compito per cui è stato progettato, come ad esempio costituire un supporto resistente, sostituire tessuti persi, favorire la ricrescita dei tessuti danneggiati.

La ricerca nel campo dei biomateriali è alimentata dalla necessità di trovare nuovi materiali che possano durare a lungo, a causa dell'aumento della vita media della popolazione, dell'aumentata necessità di protesi anche da parte di giovani e della necessità di ridurre il numero di revisioni che gravano sui costi della sanità pubblica. Inoltre i materiali biologici derivanti da trapianti omologhi o eterologhi hanno mostrato importanti problematiche: disponibilità limitata, necessità di un'ulteriore operazione chirurgica, potenziale trasmissione di malattie infettive, minore capacità osteoconduttiva e limitata capacità di incorporarsi nell'osso ospite.

I materiali biomedici possono essere divisi in tre tipologie principali in base alla risposta che provocano nel tessuto ospite: un materiale inerte non genera una risposta nel tessuto, un materiale bioattivo è integrato dai tessuti circostanti, un materiale degradabile si riassorbe e si incorpora nel tessuto circostante e può anche dissolversi completamente dopo un certo tempo.

I materiali comunicano con il loro intorno biologico attraverso la loro superficie. La risposta cellulare è quindi collegata alla superficie. Dopo l'impianto, tutti i materiali sono ricoperti da proteine del siero (fibronectina, vitronectina). Le proprietà della superficie del materiale determinano a che grado questo ricoprimento avverrà.

I materiali più frequentemente utilizzati nelle applicazioni mediche (per uno schema semplificato, vedi figura 1) sono: i metalli, tipicamente inerti e usati per applicazioni sottoposte a carichi, con resistenza a fatica sufficiente a sopportare l'attività giornaliera; le ceramiche, utilizzate per la loro durezza e resistenza allo sforzo in applicazioni come superfici articolari, nei denti e nelle superfici a contatto con l'osso; i polimeri, usati per la loro stabilità e flessibilità, ma anche per la bassa frizione nelle superfici articolari.

Storicamente, lo studio dei biomateriali si è concentrato principalmente sulle caratteristiche meccaniche dei materiali: il progresso nello studio delle altre problematiche relative all'uso di protesi e sostituti sintetici è testimoniato dalle diverse generazioni di impianti. Gli impianti di prima generazione erano impianti ad hoc, specificati dai chirurghi utilizzando materiali comuni; i successi ottenuti erano accidentali piuttosto che derivanti dal loro design, ad esempio: capsule d'oro, protesi

di PMMA (poli-metilmetacrilato), piatti ossei di acciaio, occhi di vetro. La seconda generazione di impianti è costituita da protesi ingegnerizzate utilizzando materiali comuni sviluppati attraverso collaborazioni tra medici e ingegneri; furono costruiti sulle esperienze degli impianti di prima generazione, utilizzando i progressi nella scienza dei materiali e in altri campi della ricerca. Esempi di questo tipo sono: impianti dentali e ortopedici in lega di titanio, impianti ortopedici in Co-Cr-Mo, protesi di anca con superfici sotto sforzo in polietilene UHMW (Ultra High Molecular Weight) e valvole cardiache. La terza generazione di impianti è stata bioingegnerizzata utilizzando tecnologie, materiali e cellule più sofisticati, con ancora pochi esempi sul mercato e molti in fase di sviluppo. Appartengono a questo gruppo gli impianti pensati per far ricrescere piuttosto che rimpiazzare i tessuti tramite l'uso di componenti biologici geneticamente ingegnerizzati.

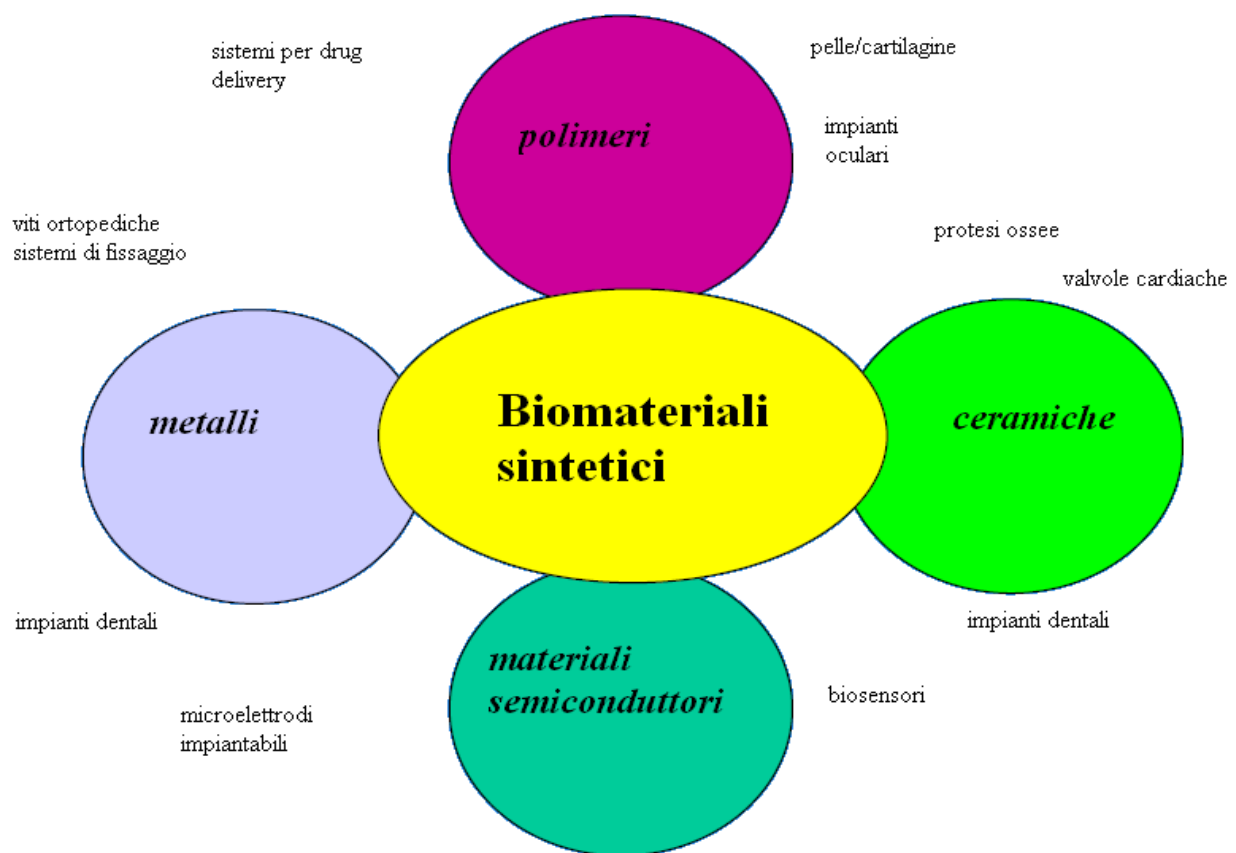


Figura 1: esempi di biomateriali sintetici e loro principali applicazioni.

Proprio di quest'ultima generazione di biomateriali e delle strategie utilizzate in Tissue Engineering (una nuova branca della Scienza dei materiali biomedici) si occuperà il presente lavoro di tesi, investigando sia i nuovi materiali utilizzati in campo ortopedico (con particolare attenzione ai materiali compositi), sia studiando i meccanismi per favorire l'adesione tra materiale e cellule.

B - TISSUE ENGINEERING

Il termine “Tissue Engineering” (TE) fu coniato durante il convegno della società nazionale di bioingegneria di Washington nel 1987 ed è definito come il campo interdisciplinare in cui i principi dell’ingegneria e delle scienze della vita sono applicate al fine di generare sostituti biologici per la creazione, il mantenimento o la riparazione di funzioni biologiche perse. [1] Essendo un campo di studi multidisciplinare, gli ambiti di studio sono diversi tra loro e richiedono competenze specifiche:

- scaffold: ovvero materiali studiati per supportare la crescita cellulare e l'integrazione con i tessuti viventi (in questo campo sono attivi ingegneri, fisici, chimici, scienziati dei materiali...);
- cellule: adatte al tipo di tessuto che si vuole sostituire (campo di attività per medici e biologi);
- molecole segnale: ad esempio fattori di crescita e proteine di adesione che devono trasmettere alle cellule lo stimolo per colonizzare e diffondere all'interno dei materiali.

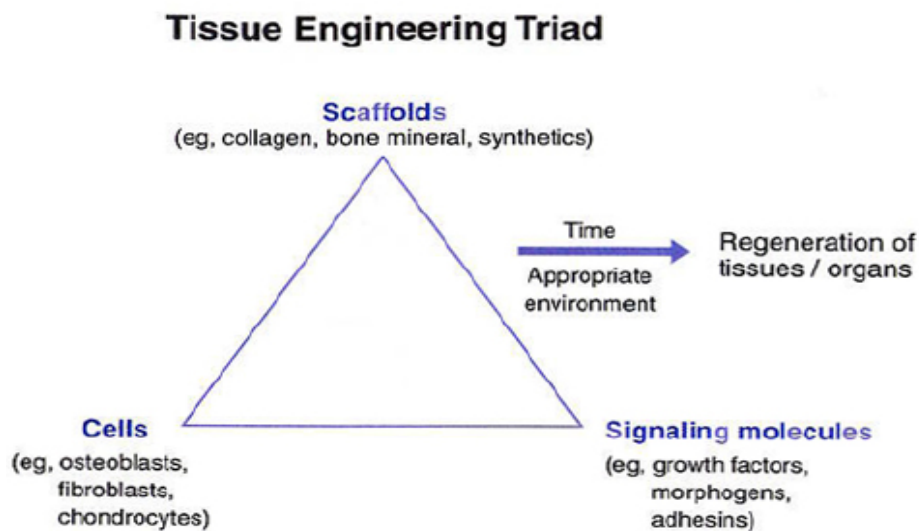


Figura 2: la “triade” della Tissue Engineering.

Langer e Vacanti [2] hanno spiegato le strategie generali praticate in Tissue Engineering:

- infusione di cellule isolate (ed eventualmente manipolate) o sostituti di cellule;
- infusione o impianto di sostanze che inducono la crescita di tessuti, come polipeptidi fattori di crescita o morfogenetici;
- impianto di cellule con o senza matrice.

Il concetto alla base di queste strategie è che le cellule possiedono un potenziale innato ad organizzarsi in tessuti ed organi se fornite dell’ambiente appropriato e di segnali biochimici, meccanici ed elettrici e che le cellule coltivate in un ambiente che simula l’originale ambiente di crescita si evolveranno in tessuti che assomigliano alle strutture native. [3]

Nello sviluppo dei nuovi biomateriali attraverso le tecniche del Tissue Engineering (figura 3), devono essere studiate le condizioni per la rigenerazione del tessuto in situazioni in cui il corpo non

ha il potenziale per la rigenerazione. Ciò avviene usando sostituti biologici viventi attraverso la selezione, l'espansione e la modulazione delle cellule progenitrici in combinazione con materiali che supportino e guidino la rigenerazione in presenza di fattori di crescita. Le cellule capaci di iniziare e sostenere il processo di rigenerazione vengono innescate attraverso segnali biologici come i fattori di crescita o geni in modo che possano generare nuovi e funzionali tessuti del tipo richiesto. Si possono ingegnerizzare le matrici che circondano i materiali per facilitare la crescita delle cellule per ottenere una rigenerazione *in situ* di ossa o cartilagini.

Mentre il progresso della TE ha generato grande interesse, ci sono ancora numerose difficoltà da superare: sviluppo di nuovi materiali come scaffold, una migliore comprensione del riconoscimento e rigetto immunologico, la regolazione della crescita, della differenziazione e morte cellulare [4-7]. Questo lavoro di tesi si propone di studiare tutti e tre gli elementi fondamentali dello sviluppo di uno scaffold per Tissue Engineering: nella prima parte della discussione verranno caratterizzati due nuovi tipi di materiale composito polimero-polimero (matrice di poli-caprolattone con fibre di acido polilattico) e polimero-ceramico (policaprolattone-idrossiapatite), sia prima che dopo un processo di degradazione *in vitro* (con e senza cellule); nella seconda parte si tratterà della funzione di molecola segnale svolta da un nuovo tipo di polipeptide di adesione con struttura ripetitiva AEK (alanina-acido glutammico-lisina).

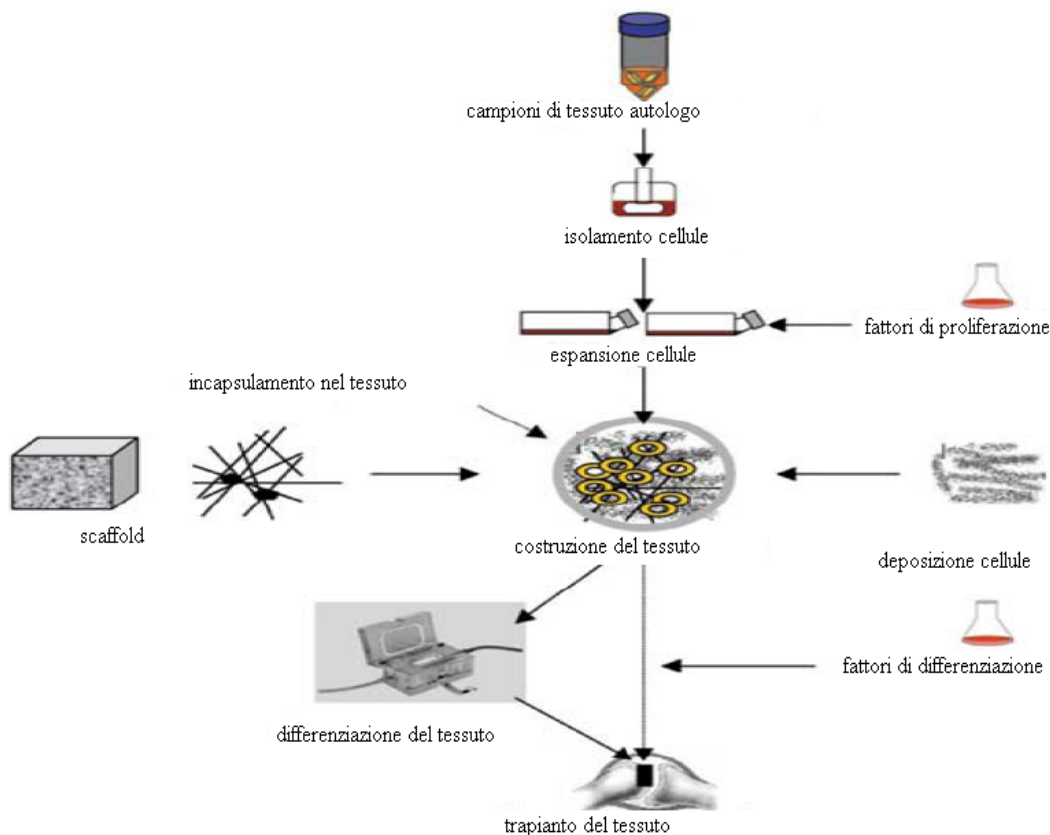


Figura 3: schema dei diversi passaggi che portano alla nascita di un impianto per Tissue Engineering.

I - Terminologia

E' opportuno, prima di procedere oltre, fare un richiamo dei termini specifici utilizzati nel campo dei biomateriali. Essi infatti sono di primaria importanza per definire le caratteristiche di matrici e materiali e, a causa di un uso spesso improprio, possono generare confusione e fraintendimenti.

Biomateriale: è una sostanza (che non sia un medicinale) o una combinazione di sostanze, sintetiche o di origine naturale, che possono essere usate per un certo periodo di tempo, come intero o parte di un sistema che curi, aumenti o sostituisca un tessuto, organo o funzione del corpo. (National Institute of Health Consensus Conference, Bethesda, MD, 1982).

Biocompatibilità: è l'abilità di un materiale di svolgere una specifica funzione con un'appropriata reazione nell'ospite. (Consensus Conference of the ESB, Chester, UK, 1986). La biocompatibilità interessa due componenti: un aspetto generale di biosicurezza che riguarda l'esclusione di effetti deleteri di un biomateriale sull'organismo, inoltre un aspetto specifico di biofunzionalità che concerne la necessità di un materiale di non essere solo privo di effetti nocivi, ma anche di suscitare una risposta benefica per un funzionamento ottimale del dispositivo medico. Un materiale per essere biocompatibile non deve causare infiammazione croniche, infezioni, trombogenesi, neoplasmi, deve essere non tossico nella sua forma primaria e non degradare in componenti tossici.

Osteogenesi [8]: formazione e sviluppo di tessuto osseo da parte degli osteoblasti.

Osteoinduzione [8]: processo attraverso il quale le cellule staminali sono convogliate in un sito di riparazione dell'osso e stimolate in modo da iniziare il cammino della differenziazione osteogenetica.

Osteoconduzione [8]: processo con cui le cellule osteogenetiche migrano verso la superficie del biomateriale attraverso un coagulo di fibrina creatosi dopo l'impianto [9]. La formazione di nuovo osso avviene sulla superficie del materiale, che dovrebbe fornire un ambiente appropriato all'adesione e alla proliferazione delle cellule ossee e della proteine morfogenetiche dell'osso (BMP) [10]. L'osteconduzione è cruciale nelle condizioni di impianto dove c'è scarsa qualità ossea o un'incongruenza tra impianto e letto osseo.

Scaffold: materiale di supporto che provvede alla ricrescita del tessuto osseo (osteconduzione).

Biodegradazione: degradazione indotta dall'attività vitale di un organismo e non semplicemente la degradazione di un materiale in un ambiente fisiologico. La biodegradazione avviene schematicamente attraverso 4 passaggi: assorbimento di acqua o liquidi biologici, riduzione delle proprietà meccaniche, riduzione della massa molare e perdita di peso, produzione di particelle con

un rapporto superficie/volume maggiore.

Bioassorbimento: si dovrebbe riferire ai materiali che vengono eliminati dal loro sito iniziale con o senza degradazione della catena polimerica. Un materiale bioassorbibile è anche biodegradabile, ma non viceversa.

Bioriasorbibile: materiale i cui prodotti di degradazione entrano nei processi metabolici o sono eliminati con cicli naturali.

Bioerosione: implica la dissoluzione in acqua di polimeri inizialmente non idrosolubili alla superficie o in massa.

II - Scaffold

Uno scaffold è un componente critico della TE, in quanto destinato a rilasciare, contenere e formare il nuovo tessuto *in vitro* o a promuovere la riparazione del tessuto in vivo. La porosità, l'architettura e la velocità di degradazione sono aspetti importanti del materiale che permettono la crescita delle cellule che guidano la formazione dell'osso.

Uno scaffold ideale dovrebbe avere le seguenti caratteristiche:

- biocompatibilità appropriata, non inducendo nessuna reazione avversa nel tessuto ospite;
- velocità di degradazione appropriata in modo da corrispondere al processo di rigenerazione dei tessuti;
- adeguata distribuzione delle dimensioni dei pori per permettere alle cellule sufficiente spazio per crescere, accesso ai nutrienti e ai metaboliti;
- elevata area superficiale per fornire alle cellule sufficiente area per aderire;
- appropriata interazione con le cellule per favorirne la differenziazione e la crescita delle cellule;
- parametri strutturali appropriati per modulare la biosintesi cellulare.

Uno scaffold sintetico ha funzioni essenzialmente osteoconduttive e quindi non rappresenta l'ideale: quest'ultima condizione è realizzata solamente impiegando osso autogeno che infatti fornisce le cellule osteogenetiche e i fattori di crescita osteoinduttivi propri del paziente, ma può essere utilizzato in un numero limitatissimo di casi a causa dello scarso volume di osso ottenibile e della possibile infezione del sito di prelievo. [11]

Nelle procedure di laboratorio, le cellule vengono seminate sullo scaffold in modo da essere poi trapiantate nel sito necessario. Quando le cellule aumentano di numero iniziano a entrare nei pori interni dello scaffold. Se la porosità e l'interconnessione tra i pori sono buone, le cellule crescono e colonizzano tutto lo scaffold rilasciando la loro matrice extracellulare. Lo strato superiore delle cellule consuma più ossigeno e nutrienti, limitandone quindi la quantità disponibile per le cellule che stanno migrando all'interno dello scaffold; la massima profondità alla quale le cellule riescono a sopravvivere corrisponde alla profondità di penetrazione cellulare.

a - Materiali per scaffold

1 - Ceramiche

Le ceramiche sono un'ampia classe di materiali inorganici non metallici (allumina, idrossiapatite, vetri ecc.) i cui atomi sono legati da legami ionici o covalenti. Formano un reticolo cristallino simile a quello dei metalli, ma a causa della presenza di specie cariche subiscono difficilmente deformazione meccanica; per questo motivo hanno resistenza meccanica migliore dei metalli e dei polimeri, ma sono estremamente fragili.

Le ceramiche possono essere divise in tre principali tipi, a seconda del loro comportamento in vivo e della risposta dei tessuti: riassorbibili (calcio-fosfati), bioattivi (idrossiapatite), bioinerti (allumina, zirconia).

L'idrossiapatite (HA) è la componente inorganica primaria dell'osso, ha formula $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, con rapporto calcio/fosfato 1,67 e una struttura molto simile all'apatite naturale $\text{Ca}_{10-x}(\text{PO}_4)_x(\text{OH})_{2-x}$.

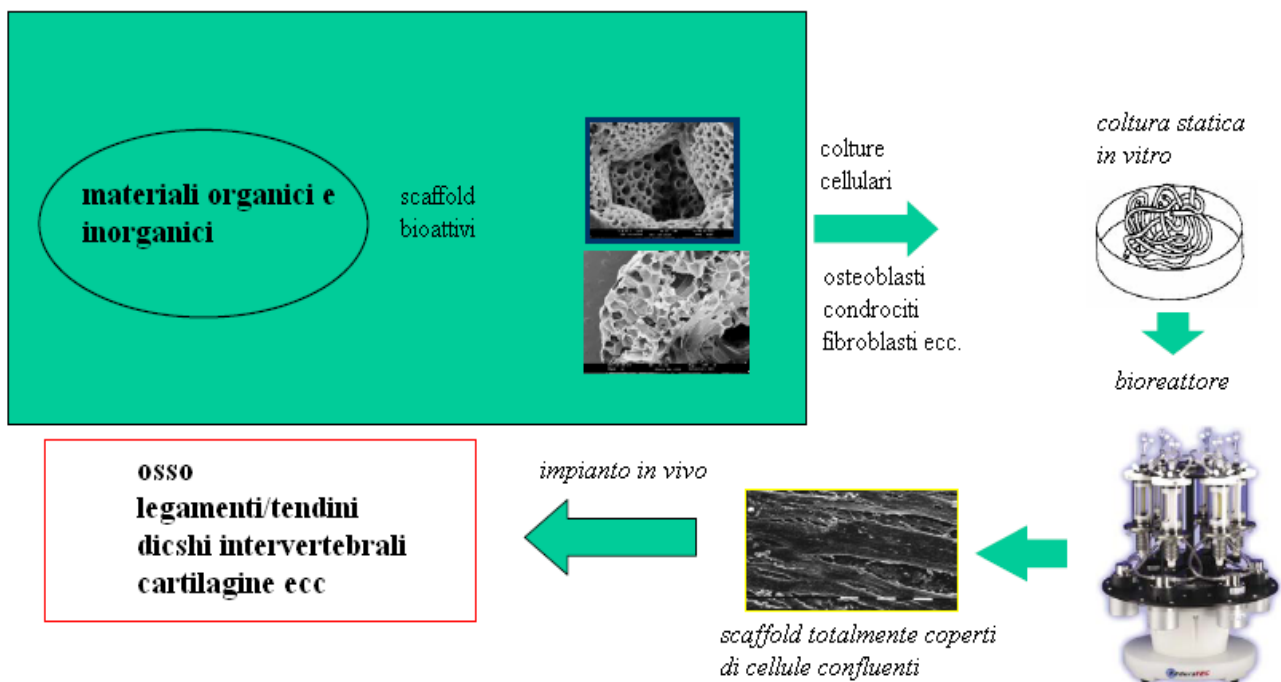


Figura 4: serie di processi al quale deve essere sottoposto ogni materiale utilizzato come scaffold: solo se il materiale viene sufficientemente colonizzato dalle cellule, esso può essere impiegato con successo anche in vivo.

Essa risulta essere presente nei tessuti quali l'osso, la dentina e lo smalto dei denti, mentre altri calcio fosfati sono stati identificati in presenza o assenza di apatite come costituenti delle calcificazioni patologiche. Questi calcio fosfati sono metastabili in condizioni fisiologiche e tendono a trasformarsi in fasi più stabili: intorno a pH 7.2 in una soluzione supersatura di Ca e P, i primi prodotti che precipitano sono la brushite e l'ottacalciofosfato, che richiedono una bassa energia di formazione. L'idrossiapatite si può formare in seguito da questi precursori metastabili. I

calcio fosfati sono caratterizzati da diversi valori del rapporto molare Ca/P; l'HA presenta un rapporto di 1.67 ed è il composto che maggiormente assomiglia alla componente minerale del tessuto osseo e degli altri tessuti calcificati. In realtà esistono differenze di composizione e di proprietà chimiche tra le apatiti biologiche e l'idrossiapatite stechiometrica. Le apatiti biologiche presentano valori variabili di rapporto Ca/P nel range 1.54 - 1.73 e spesso incorporano altri ioni come Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , F^- , HPO_4^{2-} , CO_3^{2-} .

La struttura dell'apatite (figura 5) può essere considerata in prima approssimazione un assemblaggio di ioni PO_4^{3-} e ioni Ca^{2+} attraversato da canali (le cui pareti sono costituite da ioni metallici) in cui sono ospitati gli ioni OH^- . La caratteristica principale della sua struttura è proprio la presenza di questi canali che permettono lo scambio degli ioni diversi dall' OH^- . La presenza di ioni estranei influenza notevolmente le proprietà chimico-fisiche dell'apatite. Ad esempio sostituendo gli ioni OH^- con ioni CO_3^{2-} si ha un aumento della solubilità e una diminuzione della stabilità termica dell'apatite. Gli ioni F^- hanno invece un effetto opposto.

Nel tessuto osseo i calcio fosfati sono presenti prevalentemente sotto forma di apatite cristallina, sono poco solubili e presentano una grande resistenza alle variazioni di pH (entro un range che va da 4 a 9).

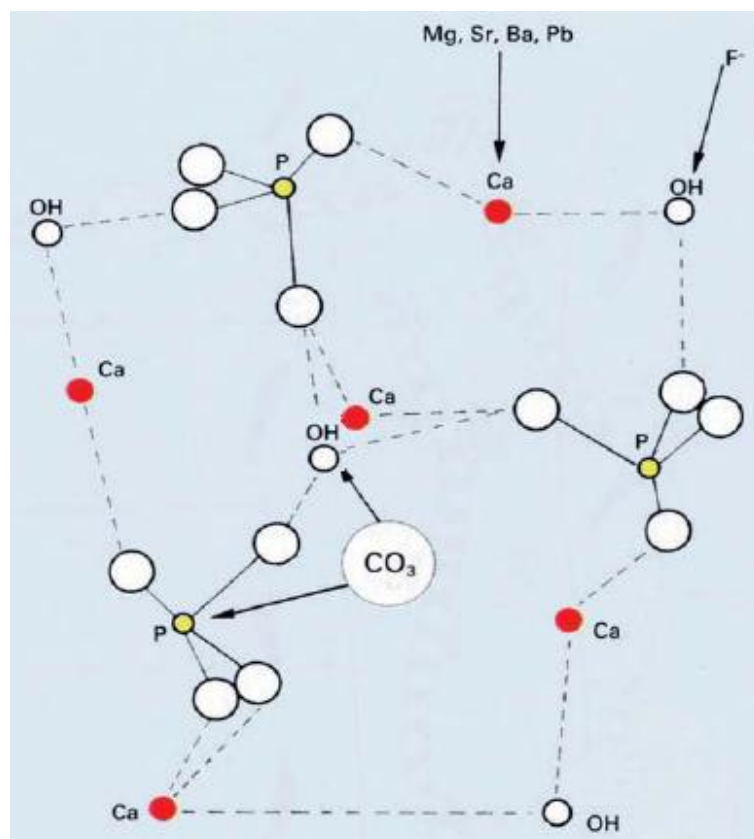


Figura 5: struttura cristallina dell'idrossiapatite (HA), con le possibili sostituzioni all'interno del reticolo cristallino di anioni monovalenti (carbonato e fluoruro) e cationi bivalenti (elementi del secondo gruppo)

L'idrossiapatite è biocompatibile e osteoconduttiva, ma non è osteogenica né osteoinduttiva e costituisce un supporto iniziale con scarse proprietà meccaniche, che ne per mettono l'uso come riempimento nel caso di difetti ossei o per ricoprire impianti metallici per migliorarne le proprietà superficiali dal punto di vista della compatibilità. Infine, manca della connettività tra i pori ed è fragile.

L'idrossiapatite, ha dimostrato di essere in grado di condurre la formazione di tessuto osseo e di formare legami chimici con l'osso senza interposizione di uno strato fibroso. I meccanismi che portano alla formazione di questo legame sono ancora in fase di studio. Nonostante la scarsa solubilità dei calcio fosfati, essi possono comunque rilasciare ioni Ca^{2+} e PO_4^{3-} in ambiente acquoso, formando sull'impianto uno strato ricco di calcio fosfato; in più la somiglianza tra il reticolo cristallino dell'impianto e della fase minerale dell'osso può provocare la deposizione di una fase cristallina sull'altra (*epitassia*). Si ha quindi un processo di dissoluzione/riprecipitazione e di crescita epitassiale. Come risultato delle sue proprietà osteoconduttive, HA è stata utilizzata per la ricostruzione di articolazioni in forma di ricoprimento dei dispositivi come coppe acetabolari.

2 - Polimeri

I polimeri sono materiali organici generati da polimerizzazioni controllate di singole molecole dette monomeri. Le reazioni di polimerizzazione possono essere a step (reazioni di condensazione) per ottenere ad esempio poliesteri, oppure reazioni radicaliche di addizione per ottenere polistirene o polietilene.

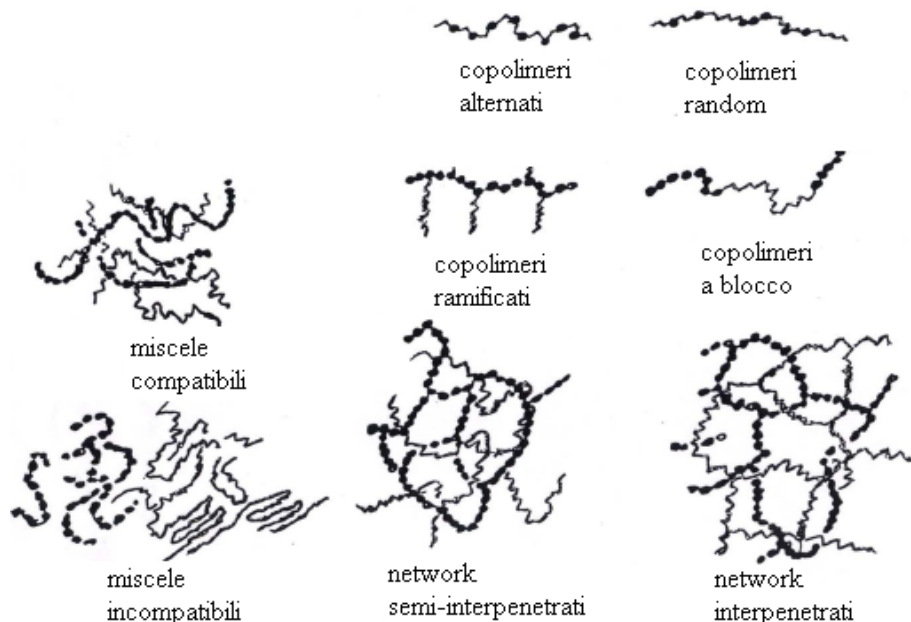


Figura 6: diverse morfologie in cui possono presentarsi i polimeri.

Gli impianti costituiti da biomateriali polimerici posseggono alcuni vantaggi, alcuni dei quali sono [12]:

- essere facilmente fabbricati in diverse forme (solidi, film, materiali viscoelastici ecc.);
- possibilità di modulazione delle proprietà chimiche, fisiche e meccaniche formando copolimeri o miscele utilizzando differenti monomeri nello stesso polimero;
- rispetto ai metalli non vengono corrosi;
- la densità dei polimeri è simile a quella dei tessuti naturali (1 g/cm^3);
- vista la loro somiglianza con i tessuti naturali (ad esempio il collagene) è possibile incorporare altre sostanze (ad esempio l'eparina) per legame diretto.

Gli svantaggi legati al loro utilizzo sono invece:

- il basso modulo elastico, soprattutto per i polimeri degradabili, che limita il loro uso nelle applicazioni dove è richiesta una grande resistenza al carico;
- la natura stessa della polimerizzazione che li rende materiali biodegradabili nel corpo;
- la difficoltà nell'ottenere polimeri utilizzabili come biomateriali senza utilizzare additivi, antiossidanti e plasticizzanti.

I polimeri possono presentare diverse strutture: copolimeri alternati, random, ramificati, a blocchi, possono costituire network interpenetrati, oppure possono costituire miscele compatibili o incompatibili secondo la miscibilità dei polimeri (figura 6).

I polimeri biomedici, a seconda del loro comportamento dopo l'impianto o quando sono in contatto con i fluidi biologici, possono essere classificati in non degradabili o biodegradabili. Tipici polimeri non degradabili sono: polietilene ad elevato peso molecolare, usato in ortopedia; polimetilmetacrilato, polimerizzato *in situ* per i cementi ossei o utilizzato per lenti a contatto; polidimetilsilossano, usato per tessuti molli e lenti intraoculari. In questa tesi saranno trattati esclusivamente polimeri biodegradabili.

Le principali caratteristiche dei polimeri biodegradabili sono:

- avere adeguate proprietà meccaniche, restando sufficientemente resistente fino a quando il tessuto circostante non sia guarito;
- non provocare reazioni infiammatorie o tossiche;
- essere metabolizzati dal corpo dopo aver compiuto il loro compito non lasciando nessuna traccia;
- essere facili da lavorare per ottenere il prodotto finale;
- essere resistenti al tempo di scaffale;
- essere facili da sterilizzare.

I polimeri biorassorbibili sono materiali polimerici, generalmente poliesteri alifatici, che si degradano in ambiente fisiologico attraverso l'idrolisi del legame estereo. Per questa proprietà sono studiati per applicazioni a breve termine che richiedono solo la presenza temporanea dell'impianto polimerico: materiali di sutura, mezzi di fissaggio ortopedici, membrane periodontali, sistemi a rilascio controllato di farmaci. Queste diverse applicazioni richiedono impianti con velocità di

biodegradazione diversa, che quindi deve essere programmata e predeterminata sulla base delle specifiche applicazioni cliniche. A questo proposito è importante identificare i fattori che influenzano la velocità di biodegradazione e il suo meccanismo: la diminuzione di peso molecolare, un maggiore grado di disordine strutturale accelerano la degradazione. Inoltre, cambiando la composizione del polimero è possibile modulare le proprietà della degradazione.

Il principale meccanismo di degradazione della maggior parte dei polimeri bioassorbibili è la degradazione idrolitica [13], schematizzata in figura 7. In particolare, l'acido polilattico viene degradato a glicina e successivamente a piruvato, successivamente entra nel ciclo di Krebs, dando come prodotti finali CO_2 , H_2O ed energia.

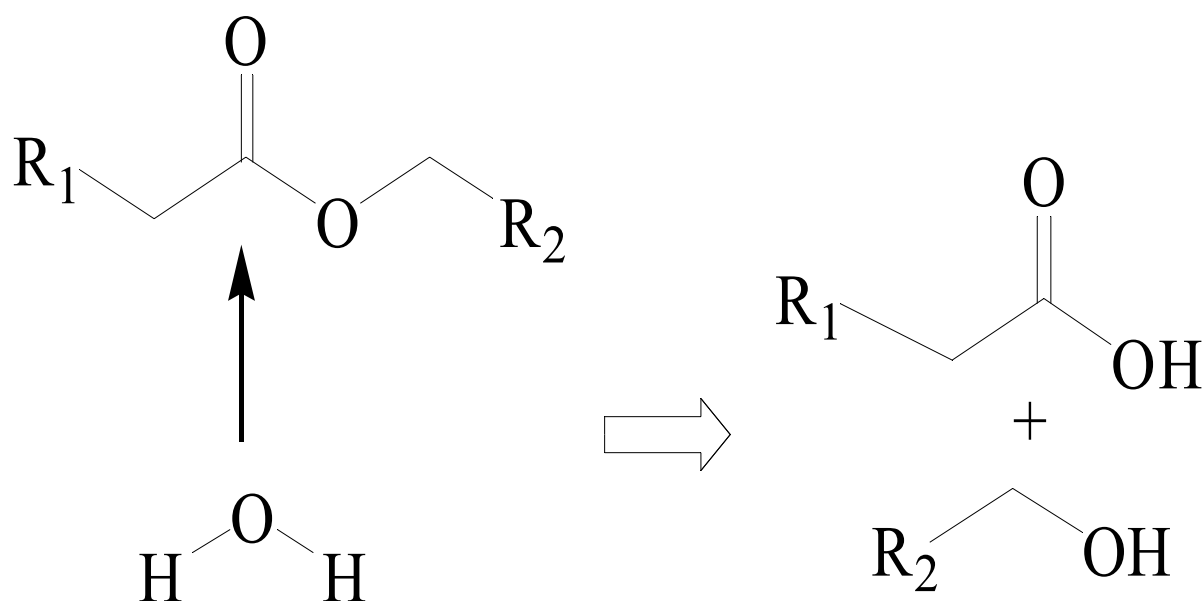


Figura 7: Meccanismo di degradazione dei poliesteri

In base alla struttura del polimero assorbibile, essi possono anche subire degradazione enzimatica, in cui il polimero è degradato o assorbito da alcuni enzimi. La composizione del polimero influenza molto la degradazione enzimatica ed essa avviene sempre in connessione alla degradazione idrolitica.

L'idrolisi dei polimeri sintetici con legami idroliticamente deboli può essere divisa in due categorie: meccanismo di degradazione di bulk e meccanismo di erosione superficiale. Nella degradazione di bulk la velocità di penetrazione dell'acqua è maggiore della velocità di rottura dei legami, nell'erosione avviene il processo inverso.

I fattori che influenzano la degradazione idrolitica sono di tipo microstrutturale e macrostrutturale e sono riassunti nella tabella 1.

FATTORI MICROSTRUTTURALI	FATTORI MACROSTRUTTURALI
struttura chimica	dimensione e geometria dell'impianto (design)
composizione chimica del polimero (unità più idrofiliche velocizzano la degradazione)	rapporto peso/superficie
distribuzione delle unità ripetitive	metodo e condizioni di processo
presenza di gruppi ionici	eventuali trattamenti termici
presenza di unità inaspettate o difetti di catena	metodo di sterilizzazione
permeabilità all'acqua	durata e condizioni dell'immagazzinamento
struttura configurazionale	ambiente di impianto
peso molecolare e sua distribuzione (polidispersione)	pH, forza ionica e temperatura del mezzo di degradazione
morfologia e grado di cristallinità	composti adsorbiti e assorbiti
Presenza di microstrutture e di stress residui	meccanismo di degradazione
Porosità e qualità della matrice e della superficie	

Tabella 1: i principali fattori che influenzano la velocità di degradazione dei polimeri.

I poliesteri usati come supporto sono ad esempio: acido polilattico (PLA), acido poliglicolico (PGA), policaprolattone (PCL) e loro copolimeri. L'acido polilattico possiede uno stereocentro che quindi genera 2 possibili isomeri: un polimero costituito da isomeri L è semi-cristallino, mentre quello D è più amorfo. Le principali caratteristiche dei poliesteri usati come materiali biomedici sono schematizzate in tabella 2.

I polimeri biodegradabili sono impiegati nella Tissue Engineering, specialmente per la rigenerazione guidata di ossa e cartilagini. Le caratteristiche superficiali dei materiali, insieme alla topografia, chimica e energia superficiale, giocano un ruolo importante nell'adesione degli osteoblasti sul biomateriale. In questo campo il PCL sta ricevendo grandi attenzioni per le sue eccellenti proprietà fisiche, di compatibilità con i tessuti e degradazione controllata, che dipende da porosità e copolimerizzazione.

PCL e PLA sono i polimeri biodegradabili investigati nel corso di questo lavoro di dottorato.

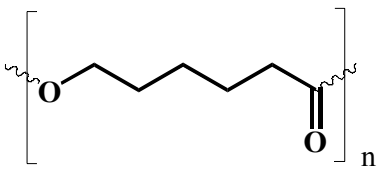
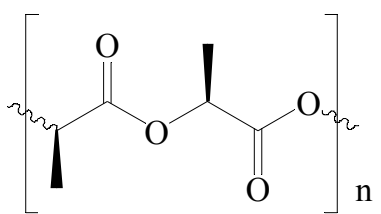
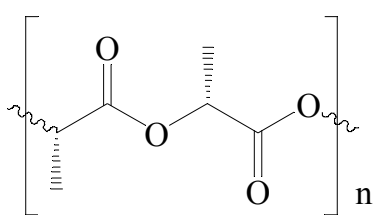
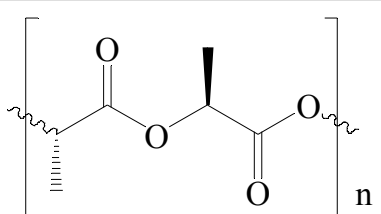
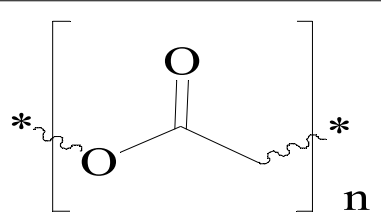
Nome	Formula	Tfus	Tg	Modulo elastico	Tempo degradazione
PCL		60 °C	-60 °C	0.4 GPa	> 36 mesi
PLLA		175°C	65°C	1.7 GPa	> 24 mesi
PDLA		180°C	65°C	3 GPa	12 mesi
PDLLA		max 220-230°C (50:50)	60-70°C	2-5 GPa	> 24 mesi (50:50)
PGA		225°C	35°C	7 GPa	4-6 mesi

Tabella 2: proprietà dei poliesteri.

3 - Materiali compositi

I compositi sono una combinazione eterogenea, su scala macroscopica, di materiali diversi per composizione, morfologia e proprietà fisiche, sintetizzati per ottenere specifiche proprietà fisiche, chimiche e meccaniche. Il vantaggio dei compositi è quello di mostrare le migliori caratteristiche dei diversi costituenti e talvolta di possederne altre che i singoli componenti non hanno [14]. Solitamente consistono di una matrice a cui una è aggiunta fase rinforzante e adeguatamente dispersa. Le fibre possono essere in vetro, carbonio o polimeri a loro volta e possono essere lunghe (compositi a matrice continua) o piccole (discontinui).

I materiali compositi hanno finora trovato applicazione in quasi tutti i campi della medicina

rigenerativa (applicazioni cardiovascolari, materiali e protesi dentarie, materiali ortopedici, cementi e articolazioni artificiali).

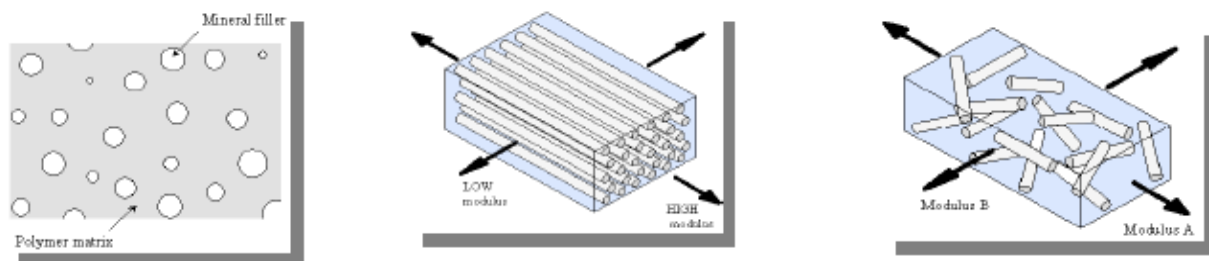


Figura 8: compositi a matrice continua e discontinua.

I compositi biodegradabili devono avere parametri strutturali che possono essere ottimizzati usando matrici appropriate e il giusto grado di rinforzo; l'interfaccia cellule/polimero e la biosintesi cellulare possono essere ottimizzate scegliendo la matrice, le fibre e le particelle appropriate (fattori di crescita, medicinali).

A causa della maggiore complessità dei materiali compositi, solo pochi di essi hanno trovato applicazioni cliniche: i dati clinici sui materiali compositi sono ancora molto scarsi, la progettazione è notevolmente più complessa rispetto ai materiali tradizionali a causa delle maggiori variabili in fase di sintesi, i metodi stessi di sintesi sono spesso costosi e complicati, inoltre non esistono ancora standard di riferimento per le proprietà dei materiali compositi. Poiché però le potenzialità di questa classe di materiali sono molto incoraggianti, la ricerca di nuovi materiali compositi con migliori caratteristiche e maggiore facilità di produzione è particolarmente importante.

In questo lavoro di tesi sono stati studiati materiali compositi di diversa natura: a matrice polimerica con rinforzo ceramico (compositi caprolattone-carbonato apatite) e a matrice continua polimerica di caprolattone con fibre lunghe di acido polilattico.

III - Biomimetica ed interazioni superficiali

La biomimetica è lo studio della struttura e della funzione dei sistemi biologici come modello per il design e l'ingegnerizzazione dei materiali. I materiali biomimetici sono stati pensati in modo da mimare i sistemi biologici naturali con lo scopo di suscitare un'appropriata risposta cellulare per la rigenerazione dei tessuti. In particolare le tecniche di biomimetica sono applicate per agire sulle caratteristiche superficiali degli impianti che influenzano l'adsorbimento delle proteine e quindi l'interazione con le cellule: infatti subito dopo il contatto con i fluidi biologici, la superficie dell'impianto è condizionata da proteine e glicoproteine con cui le cellule ospite interagiscono. Esempi a questo proposito sono l'immobilizzazione superficiale di peptidi bioattivi che mimano parte della matrice extracellulare, proteine di adesione (collagene o fibronectina) oppure fattori di crescita (BMP) che creano un micro ambiente favorevole all'adesione e alla proliferazione cellulare.

La matrice extracellulare dell'osso è sintetizzata e disposta dagli osteoblasti. Le interazioni tra gli osteoblasti e le fibre di collagene di tipo I sono dovute al legame tra i recettori delle integrine e le sequenze RGD delle glicoproteine anioniche. Le glicoproteine e i proteoglicani contribuiscono alla formazione dello strato 3D delle fibre di collagene che conferiscono le proprietà meccaniche all'osso e inducono la mineralizzazione. Le glicoproteine sono costituite da sequenze RGD legate alle integrine degli osteoblasti, che conferiscono affinità per gli ioni Ca^{++} .

Un nuovo approccio è quello di rigenerare i tessuti di interesse facendo crescere cellule staminali del paziente sul biomateriale. Ciò permette alle cellule di crescere, differenziarsi e secernere nuova matrice extracellulare, cioè mimando il substrato naturale per quel particolare tessuto.

In questo lavoro di tesi, è stata studiata l'attività di una nuova classe di peptidi bioattivi, derivati dall'EAK-16 (polipeptide costituito da 16 residui amminoacidici con sequenza alternata di Acido Glutammico, Alanina e Lisina), funzionalizzati su una superficie di titanio per applicazioni ortopediche.

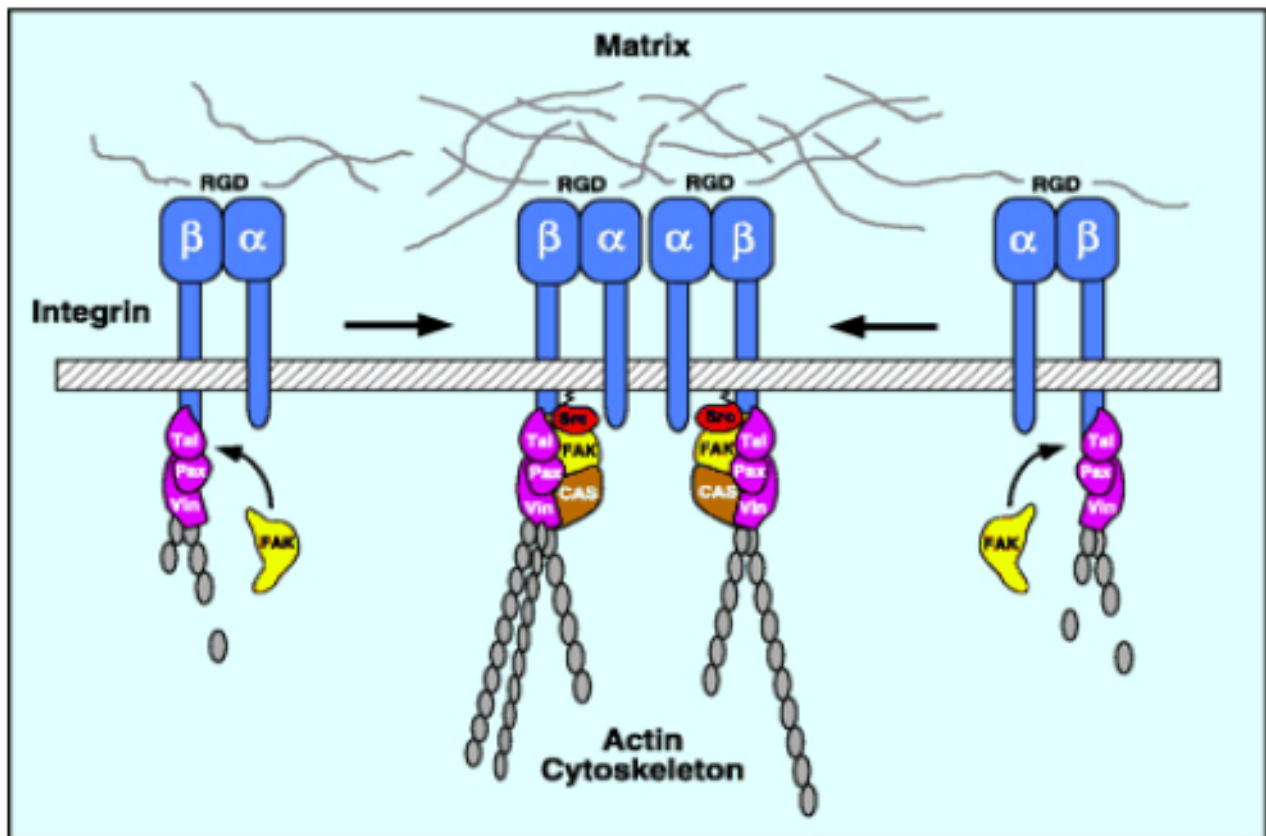


Figura 9: l'interazione tra le cellule ossee e la matrice extra-cellulare è mediata dalle integrine contenenti sequenze RGD. Le tecniche biomimetiche cercano di replicare queste interazioni tra cellule e materiali.

C - TECNICHE DI ANALISI

Ci sono due ragioni principali per caratterizzare i materiali dei dispositivi medici sottoposti a valutazione biologica: stabilire delle proprietà definite per il materiale in modo che il risultato dei test biologici possa essere strettamente legato alla formulazione specifica di un materiale, inoltre determinare la presenza e la natura di sostanze chimiche che possono essere rilasciate dal materiale (contaminanti, residui) e farsi strada nel corpo umano. Infatti i biomateriali polimerici sono composti di miscele di sostanze chimiche, alcune delle quali sono legate alla catena polimerica nella matrice del materiale, mentre altre sono libere di migrare nell'ambiente circostante (antiossidanti, contaminanti, lubrificanti, stabilizzanti, plastificanti, monomeri). Il tipo e la concentrazione di queste sostanze chimiche determina la biocompatibilità del materiale.

La caratterizzazione di un materiale dipende dal tipo di materiale, dal suo utilizzo finale e dalla funzione che il materiale deve svolgere all'interno del dispositivo. Maggiore è la criticità del ruolo del dispositivo e più importanti sono le proprietà dei materiali che lo compongono e maggiore dovrebbe essere il grado di caratterizzazione del materiale: le tecniche spettroscopiche vibrazionali sono in grado di caratterizzare in modo approfondito i biomateriali.

La spettroscopia vibrazionale è il prodotto dell'interazione tra una radiazione elettromagnetica e la materia: l'interazione avviene attraverso i legami chimici che vibrano con frequenza caratteristica se irradiati. Le tecniche spettroscopiche permettono quindi di caratterizzare i materiali a livello molecolare: in particolare esse danno informazioni per l'identificazione dei diversi componenti del materiale e le loro interazioni e per valutare la struttura e le eventuali trasformazioni (ad esempio la degradazione) dei campioni.

In spettroscopia IR si irradia il campione con una sorgente luminosa che emette radiazione infrarossa e si misurano le frequenze in cui il campione assorbe: è quindi una spettroscopia di assorbimento.

La spettroscopia Raman utilizza invece una sorgente luminosa monocromatica: il campione ha uno scattering anelastico di radiazioni la cui frequenza è la somma (bande anti-Stokes) o la differenza (bande Stokes) della frequenza della sorgente con le frequenze di vibrazione dei legami. Rispetto alla spettroscopia IR, la Raman presenta numerosi vantaggi: non è invasiva (e quindi è adatta per l'analisi di campioni biologici), ha maggiore sensibilità ed è specifica per l'analisi molecolare. Tra gli svantaggi ci sono l'elevato costo della strumentazione e l'interferenza data da contaminanti fluorescenti.

Nel campo dell'analisi dei biomateriali, la spettroscopia vibrazionale è stata impiegata per caratterizzare materiali polimerici e ceramici [15-18], così come per seguire la degradazione dei polimeri poiché è sensibile alla loro variazione di cristallinità (ovvero di ordine molecolare): è anche possibile studiare la variazione di composizione e lunghezza della catena polimerica e della struttura configurazionale [19] (orientazione delle catene laterali). Inoltre è stata impiegata con successo per studiare le strutture e le interazioni tra superfici e peptidi bioattivi.

Bibliografia

- [1] Shinoka T, Breuer C K, Tanel R E, Zund G, Miura T, Ma P X, Langer R, Vacanti J P, Mayer J E. Tissue Engineering heart valves: valve leaflet replacement study in a lamb model. *Annals of Thoracic Surgery* 1995; 60: S513-516.
- [2] Langer R, Vacanti J P. Tissue Engineering. *Science* 1993; 260: 920-926.
- [3] Thomson R C, Yaszemski M J, Powers J M, Mikos A G. Fabrication of biodegradable polymer scaffolds to engineer trabecular bone. *Journal of Biomaterials Science-Polymer Edition* 1995; 7: 23-28.
- [4] Suh H. Tissue Restoration, Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *Yonsei Medical Journal* 2000; 41: 681-684.
- [5] Terada S, Sato M, Sevy A, Vacanti J P. Tissue Engineering in the Twenty-First Century. *Yonsei Medical Journal* 2000; 41: 685-691.
- [6] Fuchs J R, Nasser B A, Vacanti J P. Tissue Engineering: A 21st Century Solution to Surgical Reconstruction. *Annals of Thoracic Surgery* 2001; 72: 577-591.
- [7] Sonal Lanal B A, Pomerantseva I, Vacanti J P. Tissue Engineering and Its Potential Impact on Surgery. *World Journal of Surgery* 2001; 25: 1458-1466.
- [8] Albrektsson T, Johansson C. Osteoinduction, osteoconduction and osteointegration. *European Spine Journal* 2001; 10: S96-101.
- [9] Davies J E. Mechanisms of endosseous integration. *International Journal of Prosthodontics* 1998; 11: 391-401.
- [10] Salgado A J, Coutinho O P, Reis R L. Bone tissue engineering: state of the art and future. *Macromolecular Bioscience* 2004; 4: 743-765.
- [11] Rummelhart J M, Mellonig J T, Gray J L, Towle H J. A comparison of freeze-dried bone allograft and demineralized freeze-dried bone allograft in human periodontal osseous defects. *Journal of Periodontology* 1989; 60: 655-663.
- [12] Gunatillake P A, Adhikari R. Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering. *European Cells and Materials* 2003; 5: 1-16.
- [13] Fukuzaki H, Yoshida M, Asano M, Kumakura M, Mashimo T, Yuasa H, Iman K, Yamanaka H, Kawaharada U, Suzuki K. A new biodegradable pasty-type copolymer of L-lactic acid and omega-valerolactone with relatively low-molecular weight for application in drug delivery systems. *Journal of Controlled Release* 1989; 10: 293-303.
- [14] Salernitano E, Migliaresi C. Composite materials for biomedical applications: a review. *Journal of Applied Biomaterials and Biomechanics* 2003; 1: 3-18.
- [15] Bertoluzza A, Fagnano C, Tinti A, Morelli M A, Tosi M R, Maggi G, Marchetti P G. Raman and Infrared spectroscopic study of the molecular characterization of the biocompatibility of prosthetic materials. *Journal of Raman Spectroscopy* 1994; 25: 109-114
- [16] Carden A, Morris M D. Application of vibrational spectroscopy to the study of mineralised tissues. *Journal of Biomedical Optics* 2000; 5: 259-258.

- [17] Lawson E E, Barry B W, Williams A C, Edwards H G M. Biomedical applications of Raman spectroscopy. *Journal of Raman Spectroscopy* 1997; 28: 111-117.
- [18] Taddei P, Tinti A, Fini G. Vibrational spectroscopy of polymeric biomaterials. *Journal of Raman Spectroscopy* 2001; 32: 619-629.
- [19] Tanaka M, Young R J. Polarised Raman spectroscopy for the study of molecular orientation distributions in polymers. *Journal of Materials Science* 2006; 41: 963-991.
- AA VV. *Biomaterial Science: An Introduction to Materials in Medicine*. Ratner B D, Hofman A S, Schoen F J, Lemons J E ed, Academic Press, San Diego (1996).
 - Billmeyer F W. *Textbook of Polymer science*. 3rd ed. Wiley-Interscience, New York (1984).
 - Flory P J. *Principles of Polymer Chemistry*. Cornell Univ. Press, New York (1953).
 - Freeman A J. *Calcified tissue*. Hukins D W L ed, CRC Press, Boca Raton, Florida (1989).
 - Hulbert S. *An introduction to bioceramics*. Hench L L, J. Wilson J ed, World Scientific, Singapore (1993).
 - Hulbert S, Bokros JC, Hench L L, Wilson J, Heimke G. *High tech ceramics*. Vinenzini P ed, Elsevier, Amsterdam (1987).
 - Miller J A, Talton J D, Bateia S. *Clinical performance of skeletal prostheses*. Hench L L, Wilson J ed, Chapman and Hall, London (1996).
 - Park J B. *Biomaterials: An Introduction*. Plenum Press, New York (1979).
 - Rosato D V. *Biocompatible Polymers, Metals and Composites*. M. Szycher ed, Technomic Publ. Lancaster (1983).
 - Silver F H, C. Doillon C. *Biocompatibility: Interactions of Biological and Implantable Materials*. Volume I: Polymers, VCH Publishers, New York (1989).
 - Williams D F. *The Williams Dictionary of Biomaterials*. Liverpool University Press, Liverpool (1999).

METODICHE STRUMENTALI DI INDAGINE STRUTTURALE

Nel presente lavoro di tesi sono state effettuate analisi di tipo chimico e fisico sui materiali, utilizzando metodiche analitiche strumentali che possono essere suddivise in due classi principali:

A - tecniche spettroscopiche vibrazionali: IR e Raman;

B - tecniche di analisi termica: termogravimetria (TG) e calorimetria differenziale a scansione (DSC).

A - TECNICHE SPETTROSCOPICHE VIBRAZIONALI

Quando una radiazione elettromagnetica interagisce con la materia essa può dare origine a diversi fenomeni fisici quali l'assorbimento, l'emissione e la diffusione.

Con il termine spettroscopia si intende l'uso analitico di tali interazioni al fine di determinare l'identità, la struttura e in alcuni casi anche la concentrazione delle specie sottoposte ad analisi; in particolare, lo studio dell'intensità e della frequenza dei fotoni prima e dopo le interazioni con la materia costituisce la base di tutte le tecniche ottiche spettroscopiche.

In questo lavoro sono state utilizzate le tecniche spettroscopiche vibrazionali, che permettono di studiare le vibrazioni dei legami presenti all'interno delle molecole.

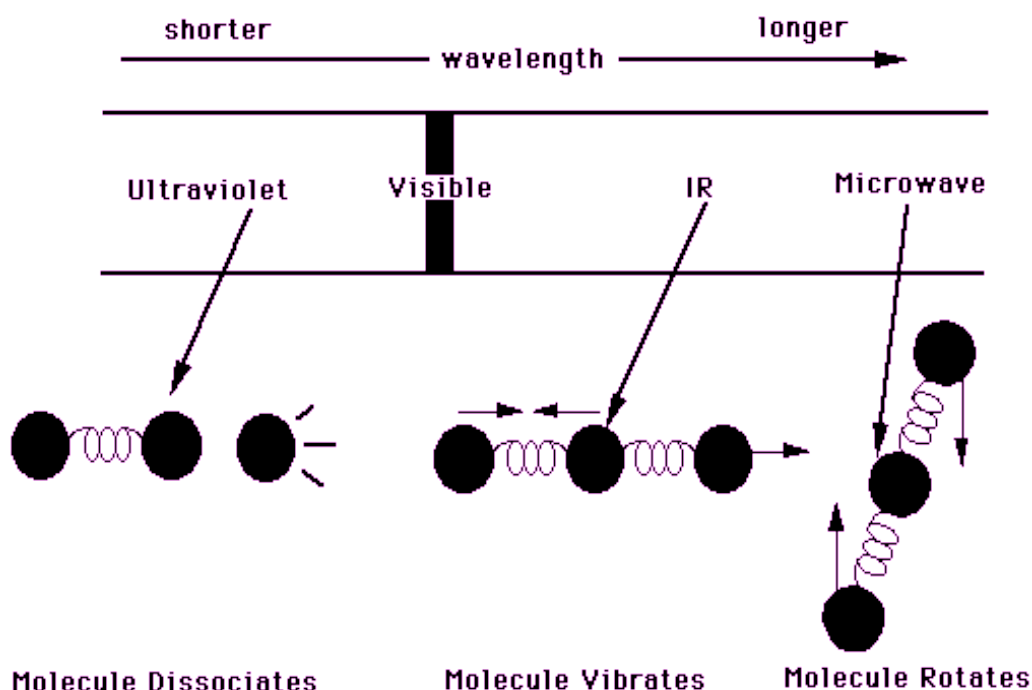


Figura 1: spettro elettromagnetico ed interazione luce-materia: la radiazione IR ha energia sufficiente per interagire con le oscillazioni dei legami molecolari.

Come è ben noto, la frequenza della radiazione utilizzata determina il tipo di spettroscopia che si sta effettuando. Infatti, a seconda della frequenza della radiazione utilizzata, (e quindi della sua energia) si avranno diversi effetti sulla materia (vedi figura 1). Se si utilizza una radiazione infrarossa (cioè con lunghezza d'onda compresa nell'intervallo 0.7-500 μm) questa avrà energia sufficiente per provocare un salto vibrazionale (dove per vibrazione si intende una oscillazione in cui gli atomi modificano periodicamente la loro posizione rispetto ad una posizione di equilibrio). Una vibrazione molecolare può essere facilmente visualizzata immaginando una molecola biatomica A-B come due sfere unite da una molla. I due atomi A e B si possono avvicinare ed allontanare periodicamente con una frequenza ν che può essere calcolata dalla legge di Hooke:

$$\nu = \frac{1}{2} \pi \sqrt{k/\mu}$$

dove ν è la frequenza della vibrazione, μ è la massa ridotta degli atomi ($m_A m_B / (m_A + m_B)$), e k è la costante di forza del legame A-B. La frequenza di vibrazione sarà quindi tanto maggiore quanto maggiore è la forza di legame e tanto minore è la massa degli atomi coinvolti.

Essendo k funzione sia della natura del legame tra A e B che delle interazioni tra molecola e mezzo, la spettroscopia vibrazionale può fornire informazioni sia sulle proprietà della molecola isolata che su eventuali interazioni intermolecolari (ad esempio l'esistenza e la forze di legami a idrogeno).

L'energia potenziale per un'oscillazione armonica di due particelle è rappresentata da una funzione parabolica. Nonostante questa sia una funzione continua, l'energia vibrazionale totale di una molecola è quantizzata e può assumere i seguenti valori:

$$E_{\text{vib}} = h (\nu + \frac{1}{2}) \nu_{\text{vib}}$$

Dove h è la costante di Planck, ν è il numero quantico vibrazionale (può assumere valori interi positivi: 0, 1, 2, 3 ...) che definisce il livello di energia e ν_{vib} è la frequenza della vibrazione. I livelli vibrazionali sono equamente spazati (figura 2 A) e la separazione tra i livelli è uguale a $h\nu$.

Il modello dell'oscillatore armonico è una semplificazione rispetto al moto vibrazionale reale, in quanto le molecole presentano vibrazioni anarmoniche. Nel modello reale dell'oscillatore anarmonico l'energia vibrazionale è quantizzata secondo la relazione:

$$E_{\text{vib}} = h [(\nu + \frac{1}{2}) \nu_{\text{vib}} - (\nu + \frac{1}{2})^2 X_e \nu_{\text{vib}}]$$

Dove X_e è una costante di anarmonicità. Dalla relazione si deduce che i livelli di energia tendono ad un asintoto all'aumentare del numero quantico vibrazionale (figura 2 B).

Le possibili vibrazioni di una molecola poliatomiche costituite da N atomi dipendono dal numero di gradi di libertà (o modi) vibrazionali della molecola stessa: essa possiede $3N$ gradi di libertà di cui 3 traslazionali e 3 rotazionali (2 nelle molecole lineari); i modi vibrazionali molecolari sono dunque

$3N-5$ se la molecola è lineare e $3N-6$ se è non lineare.

Esistono due modi di vibrazione molecolare (figura 3): di *stretching* (stiramento) e di *bending* (piegamento). Il primo è un movimento ritmico lungo l'asse di legame con conseguente cambiamento della distanza interatomica, mentre il secondo può essere dovuto ad una variazione dell'angolo di legame oppure al movimento di un gruppo di atomi rispetto al resto della molecola. Per esempio le vibrazioni di *twisting* (torsione), *rocking* (oscillazione nel piano) e *wagging* (oscillazione fuori dal piano) provocano un cambiamento degli angoli di legame rispetto a delle coordinate arbitrariamente fissate all'interno della molecola. In particolare, il numero di vibrazioni di *stretching* di una molecola è $N-1$, mentre le vibrazioni di *bending* sono $2N-5$. Solitamente, le frequenze di stretching sono a valori più alti di quelle di bending poiché è necessaria un'energia maggiore per allungare i legami anziché piegarli; inoltre i legami multipli hanno frequenze maggiori rispetto ai legami semplici a causa della costante di forza maggiore del legame multiplo (es. ν_{C-C} : $700-1200\text{ cm}^{-1}$; $\nu_{C=C}$: $1600-1680\text{ cm}^{-1}$ $\nu_{C\equiv C}$: $2250-3000\text{ cm}^{-1}$).

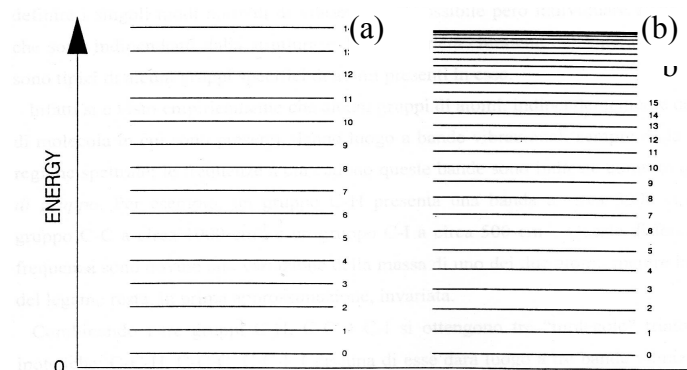


Figura 2: disposizione dei livelli di energia vibrazionale secondo il modello armonico (a) e anarmonico (b).

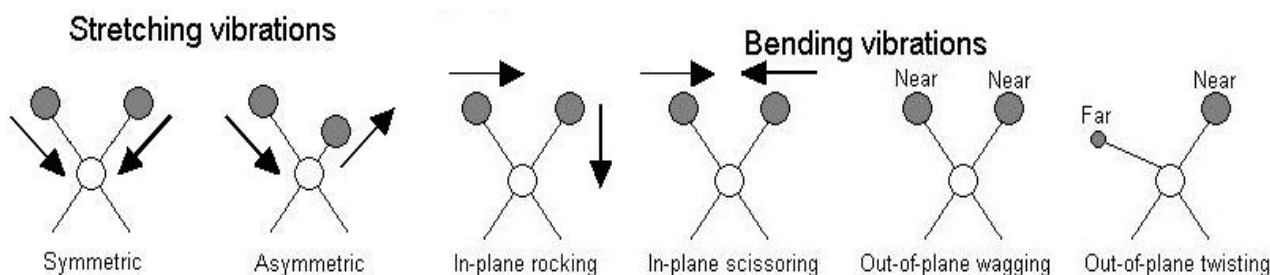


Figura 3: modi di vibrazione.

Quando due legami oscillanti condividono un atomo comune, raramente agiscono da oscillatori indipendenti in quanto vi è una interazione di accoppiamento meccanico tra gli oscillatori. L'accoppiamento di due modi di vibrazione fondamentali produrrà due nuovi modi di vibrazione, aventi frequenza superiore e inferiore a quelle osservate quando l'interazione è assente. Affinché vi sia accoppiamento vi deve essere un atomo in comune tra i gruppi e i gruppi accoppiati devono

assorbire, individualmente, a frequenze molto vicine; l'accoppiamento risulta invece trascurabile quando i gruppi sono separati da uno o più atomi.

I - Spettroscopia IR

La spettroscopia IR è una spettroscopia di assorbimento vibrazionale. La radiazione utilizzata è quella infrarossa, ovvero quella parte di spettro elettromagnetico compreso tra le regioni del visibile e delle microonde ($20 - 14000 \text{ cm}^{-1}$), anche se l'interesse pratico è limitato alla zona del medio IR ($400 - 4000 \text{ cm}^{-1}$). L'assorbimento di radiazioni IR da parte delle molecole porta a un salto tra due livelli vibrazionali. La condizione necessaria, ma non sufficiente, affinché una molecola assorba una radiazione IR è che l'energia della radiazione sia uguale alla differenza tra due livelli vibrazionali della molecola. Infatti vengono osservate nell'infrarosso solo quelle vibrazioni che portano ad una variazione del momento dipolare della molecola stessa. Il campo elettrico alternante, prodotto dal cambiamento della distribuzione di carica che si accompagna alla vibrazione, accoppia la vibrazione della molecola al campo elettrico oscillante della radiazione e si osserva un assorbimento.

Ogni gruppo funzionale può avere più modi vibrazionali che corrispondono ad energie diverse (ad esempio stretching e bending); lo stesso gruppo funzionale in differenti molecole presenta moti vibrazionali specifici, che si traducono in bande di assorbimento collocate a frequenze caratteristiche (dette frequenze di gruppo), influenzate solo marginalmente dalla complessità della struttura molecolare.

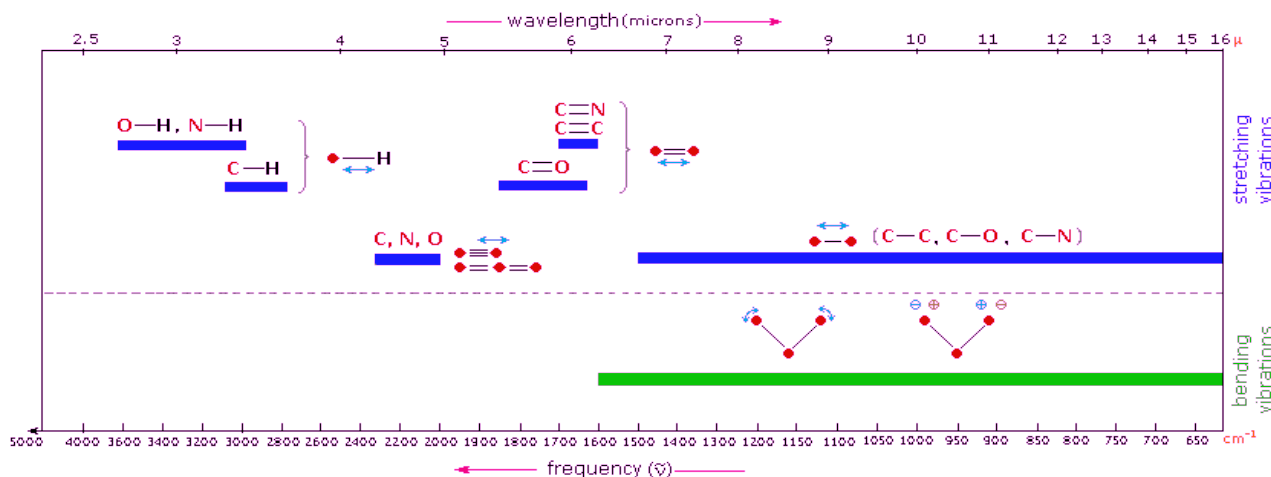


Figura 4: frequenze di gruppo in spettroscopia IR.

Uno spettro IR si ottiene irraggiando il campione con un intervallo piuttosto ampio di radiazione infrarossa e a ogni lunghezza d'onda si osserva se la radiazione viene assorbita dal campione a seconda dei gruppi funzionali presenti nella molecola.

Un parametro importante degli spettri IR è dato dalla risoluzione, ovvero dalla capacità dello strumento di discriminare due picchi adiacenti; solitamente la maggior parte degli spettri viene

registrato con una risoluzione di 4 cm^{-1} . La variazione della risoluzione ha importanti conseguenze non solo sulla qualità spettrale ma anche sui tempi di registrazione degli spettri: infatti aumentare la risoluzione significa aumentare sensibilmente il tempo necessario per ottenere uno spettro.

Per molti anni lo spettro infrarosso è stato registrato facendo passare una radiazione IR attraverso il campione ed effettuando la scansione dello spettro ruotando un elemento disperdente (prisma o reticolo a diffrazione); le aree di assorbimento (picchi) venivano rivelate e stampate come grafico delle intensità in funzione delle frequenze. Il monocromatore poteva essere inserito prima o dopo il campione. La figura 5 mostra un esempio di strumento a dispersione a doppio raggio, in cui la radiazione viene divisa in due porzioni: una attraversa il campione, mentre l'altra attraversa la cella di riferimento. Per sottrazione dei due segnali, lo spettro risultante contiene solo i picchi di assorbimento del campione.

La spettrometria infrarossa sta vivendo negli ultimi anni una seconda giovinezza, questo grazie allo sviluppo degli spettrometri IR a trasformata di Fourier (FT-IR), che presentano numerosi vantaggi rispetto alla tradizionale spettrometria dispersiva. La radiazione, che contiene tutte le lunghezze d'onda IR, viene divisa in due raggi (figura 6) da un *beam splitter* (che riflette il 50% della luce e trasmette il restante 50%). Un raggio percorre una distanza fissa, venendo riflesso da uno specchio fisso, mentre l'altro una distanza variabile, venendo riflesso da uno specchio mobile.

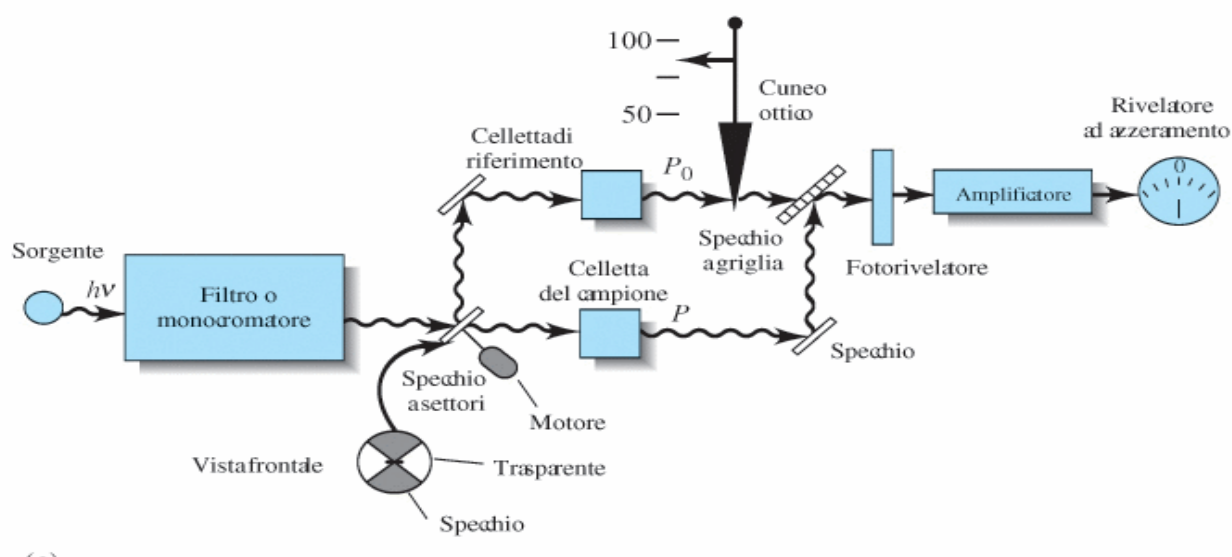


Figura 5: schema a blocchi di uno spettrofotometro IR dispersivo a doppio raggio.

Le due radiazioni tornano quindi al *beam splitter* dove si ricombinano e sono riflesse verso il campione. Le diverse lunghezze dei due percorsi portano ad una sequenza di interferenze costruttive e distruttive e, conseguentemente, a variazioni nelle intensità. In questo modo si ottiene un interferogramma (insieme di massimi e minimi), il quale è però di difficile interpretazione e viene

trasformato in spettro mediante un procedimento matematico detto trasformata di Fourier. I vantaggi che questa strumentazione offre sono molteplici. Poiché non viene utilizzato un monocromatore e tutte le frequenze della radiazione passano simultaneamente sul campione, si ha un notevole risparmio di tempo con la possibilità di accumulare, in un tempo ragionevole, una grande quantità di spettri, con un conseguente miglioramento del rapporto segnale/rumore. Gli strumenti FT-IR possono avere una risoluzione estremamente elevata, ed essendoci una conversione dei dati dall'analogico al digitale, questi possono essere facilmente elaborati. Tutti gli spettri IR mostrati in questa tesi, sono stati ottenuti con uno spettrofotometro FT-IR.

Per quanto riguarda il campionamento, i solidi possono essere analizzati in trasmissione nel caso di materiali non campionabili e non troppo spessi (ad esempio film di adatto spessore), oppure in Rifrattanza Totale Attenuata (ATR) per qualsiasi materiale posizionabile a stretto contatto con il supporto per la riflessione interna. In trasmissione, il campione (ad esempio una polvere) viene intimamente miscelato con un'opportuna quantità di KBr anidro (trasparente alla radiazione IR) in un mortaio di agata. La miscela viene poi compressa con una pressa in modo da ottenere un disco trasparente in cui il campione solido è disperso in modo omogeneo. Lo spettro può essere visualizzato in due modi: in trasmittanza o in assorbanza. La trasmittanza è il rapporto percentuale tra l'intensità della radiazione dopo il passaggio attraverso il campione e l'intensità di quella che è passata attraverso un disco di solo KBr (che funge da fondo): si ha una trasmittanza di 100 per le lunghezze d'onda che non sono assorbite dal campione e di 0 per quelle completamente assorbite. L'assorbanza è invece il logaritmo in base decimale dell'inverso della trasmittanza: le due modalità sono quindi equivalenti.

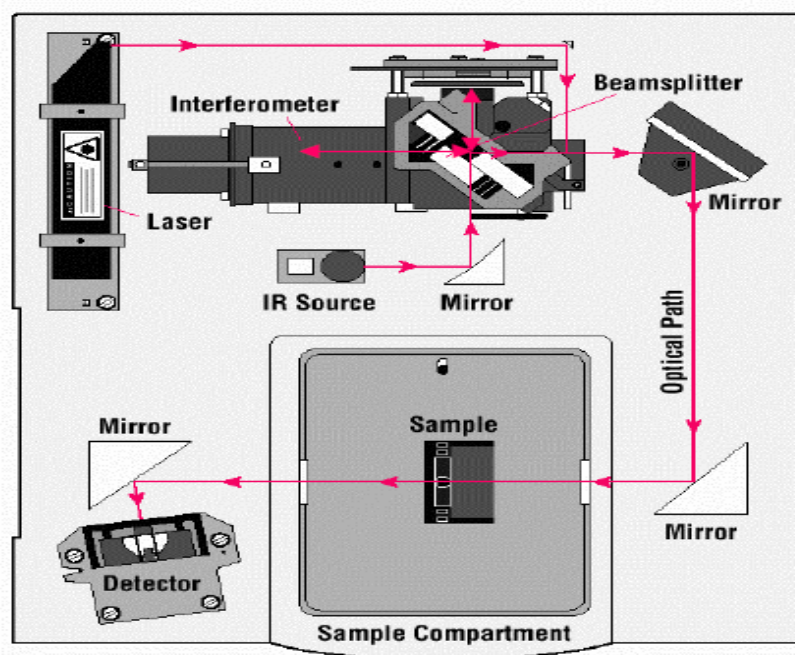


Figura 6: schema di uno spettrofotometro FT-IR.

In ATR il campione è posizionato su un supporto costituito da un cristallo con elevato indice di rifrazione (ZnSe, germanio o diamante): il raggio IR viene riflesso più volte sulla superficie interna del cristallo e quindi sul campione (figura 7), creando un'onda evanescente che si proietta ortogonalmente sul campione posto in stretto contatto con il cristallo, generando lo spettro di rifrattanza (che si calcola in modo analogo alla trasmittanza). Per ottenere lo spettro, è quindi necessario porre il cristallo ATR a contatto con la superficie del campione. La risposta analitica proviene da uno strato superficiale di campione che dipende dal materiale del cristallo del dispositivo ATR (ad esempio, utilizzando un cristallo di germanio, la radiazione incidente penetra nel campione con una profondità $> 1\ \mu\text{m}$).

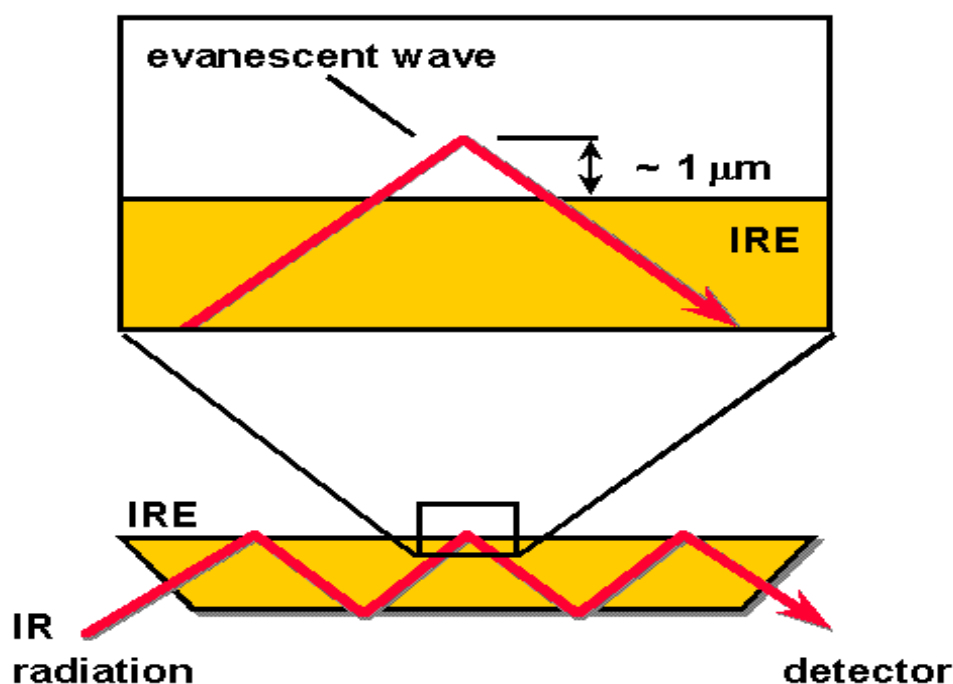


Figura 7: riflessioni all'interno di un cristallo ATR.

Gli spettri IR in modalità ATR sono simili a quelli registrati in trasmittanza (e quindi in assorbanza). Ci sono differenze sottili, in particolare le bande a frequenze basse avranno valori di assorbanza maggiori rispetto a quelle a frequenze alte; normalmente i software di gestione degli strumenti sono in grado di compensare queste differenze.

Gli spettri IR discussi in questo lavoro di tesi, sono stati ottenuti con uno strumento Nicolet 5700 FTIR, con detector a DTGS (Deuterated TriGlycine Sulfate), sia in modalità di trasmissione (ovvero in pasticca di KBr), sia in rifrattanza totale attenuata su un cristallo di diamante. Con questo strumento è possibile registrare anche spettri micro IR in quanto lo strumento è dotato di microscopio con ingrandimento $15\times$ e detector MCT (Mercury Cadmium Telluride) raffreddato ad azoto liquido.

II - Spettroscopia Raman

La spettroscopia Raman si basa sull'effetto Raman, ovvero sulla diffusione (*scattering*) anelastica dei fotoni da parte delle molecole. Essa può fornire informazioni sulla composizione molecolare, i legami, l'ambiente chimico, la fase e la struttura cristallina dei campioni in esame, ed è quindi adatta all'analisi di materiali in più forme: gas, liquidi e solidi amorfi o cristallini. L'effetto Raman è un fenomeno fisico scoperto nel 1928 dal fisico Indiano C.V. Raman, scoperta che gli valse il premio Nobel nel 1931. Egli notò che una piccola frazione della radiazione diffusa da certe molecole aveva energia diversa da quella della radiazione incidente, e che la differenza di energia era legata alla struttura chimica delle molecole responsabili della diffusione.

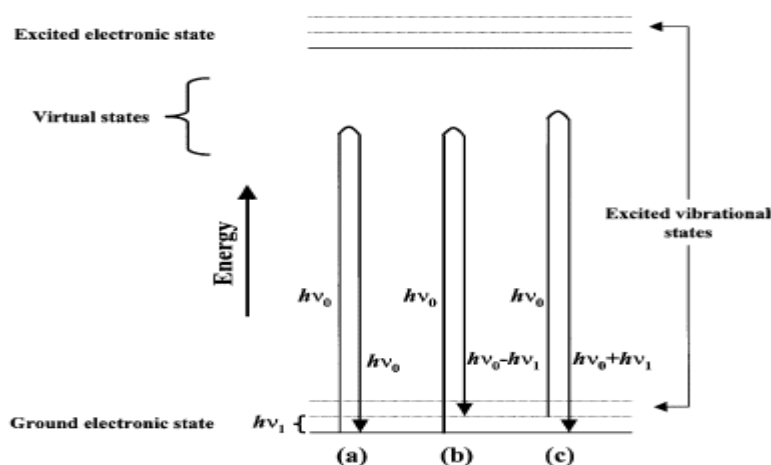


Figura 8: confronto tra diffusione elastica (a) e diffusione anelastica con effetto Raman-Stokes (b) e Raman-AntiStokes (c).

Una radiazione monocromatica coerente emessa da una sorgente laser di frequenza ν_0 può interagire con una molecola in vari modi: può essere assorbita se ha energia pari ad una possibile transizione tra due livelli energetici elettronici, vibrazionali (come nel caso dell'IR) o rotazionali, può altresì essere riflessa (se non ci sono interazioni) o diffusa, se le interazioni non causano transizioni energetiche. Si ipotizzi un'interazione tra la radiazione e una molecola che si trovi al livello vibrazionale fondamentale o ad un livello vibrazionale eccitato. Il fotone di energia $h\nu_0$ può essere assorbito dalla molecola, che aumenta la sua energia di una quantità pari all'energia del fotone (secondo la legge di Planck $E=h\nu$). In genere le molecole, dopo l'interazione con la radiazione elettromagnetica, si trovano in uno stato eccitato virtuale in quanto di solito l'energia fornita non è sufficiente a causare transizioni elettroniche e tendono a ritornare rapidamente (dopo circa 10^{-14} secondi) o al livello vibrazionale in cui si trovavano o ad un altro livello vibrazionale. Nel primo caso (diffusione elastica, cfr figura 8 A) la radiazione diffusa ha la stessa energia e quindi la stessa frequenza ν_0 della luce eccitatrice incidente (diffusione *Rayleigh*). Nel secondo caso (diffusione anelastica) la luce può essere diffusa con frequenza minore, $\nu_0 - \nu_1$ (effetto Raman Stokes, figura 8

B), o con frequenza maggiore, $\nu_0 + \nu_1$ (effetto Raman anti-Stokes, figura 8 C) rispetto alla radiazione eccitatrice. Nello *scattering* Raman la frequenza diffusa ν_0 diventa quindi $\nu_0 \pm \nu_1$, dove ν_1 dipende dalla separazione energetica tra i livelli vibrazionali ed è quindi caratteristica di una specifica vibrazione della molecola in esame; la diffusione anelastica è un evento molto meno probabile rispetto alla diffusione elastica (circa 10^6 volte) e quindi il relativo segnale è altrettanto meno intenso.

Nella spettroscopia Raman non si parla, in genere, di frequenze assolute, ma di differenza di frequenza (*Raman shift*) rispetto alla frequenza assoluta della radiazione eccitatrice: in figura 9 sono visualizzate sia la frequenza Raman, sia la frequenza assoluta delle diverse bande. Come si può notare dalla figura 9, le bande Stokes sono notevolmente più intense di quelle anti-Stokes in quanto la popolazione nello stato vibrazionale fondamentale è maggiore che nei livelli vibrazionali eccitati (distribuzione di Boltzmann), per cui si avrà una maggiore probabilità di osservare transizioni di tipo Stokes, che sono quelle effettivamente analizzate nei comuni spettri Raman: esse sono infatti legate ai gruppi funzionali della molecola in maniera analoga a quanto accade in spettroscopia IR (sebbene con regole di selezione diverse) e collocate in regioni spettrali analoghe. E' interessante notare a questo proposito, che la spettroscopia Raman consente con facilità di accedere ai numeri d'onda inferiori a 400 cm^{-1} , permettendo ad esempio di analizzare le bande del reticolo cristallino, difficilmente accessibili agli spettri IR.

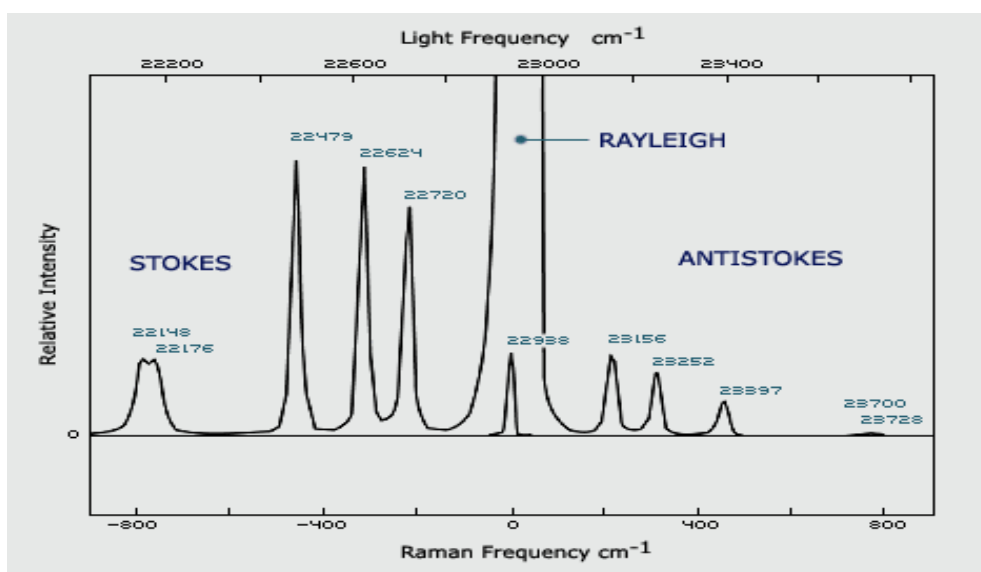


Figura 9: tipico spettro Raman si noti la simmetria tra le bande Stokes e anti-Stokes rispetto alla radiazione Raleigh e la loro intensità relativa.

L'intensità della luce diffusa dipende dalla lunghezza d'onda λ della radiazione diffusa (è inversamente proporzionale a λ^4), mentre non lo è la frequenza. Ad esempio, eccitando con luce verde a 514 nm o con luce blu a 488 nm si ottiene in entrambi i casi una banda con la stessa ν_1 in quanto la differenza tra il livello vibrazionale fondamentale e quelli eccitati rimane la stessa.

Tuttavia è importante sottolineare che in alcune applicazioni, la scelta della λ del laser è di estrema importanza: infatti l'interferenza più comune riscontrata negli spettri Raman è data dalla fluorescenza (particolarmente importante nei campioni organici di origine biologica) che comporta un aumento della linea di base dello spettro. La fluorescenza è il fenomeno fisico con il quale gli elettroni tornano allo stato energetico fondamentale dopo essere stati eccitati, con emissione di radiazione. Scegliendo una sorgente laser con frequenza minore diminuisce la possibilità far avvenire transizioni elettroniche e quindi di avere fluorescenza. Ovviamente deve essere ricercato il compromesso migliore tra la minimizzazione della fluorescenza e la diminuzione dell'intensità Raman che ricordiamo dipende da ν^4 . Esistono laser nell'UV, nel visibile e nel vicino IR: in questo lavoro di tesi sono stati utilizzati il laser ad argon-krypton in grado di emettere a diverse lunghezze d'onda (488, 514, 647 nm) e il laser Nd³⁺:YAG (granato di ittrio e alluminio drogato con neodimio) che emette nel vicino IR a 1064 nm.

Dal punto di vista della profondità di campionamento, generalmente l'analisi Raman è di tipo superficiale: le informazioni provengono da uno strato spesso alcuni μm posto sulla superficie del campione. Nel caso che il campione sia trasparente, il raggio laser può attraversare tutto il campione e lo spettro ottenuto riguarda per la maggior parte il "bulk" del campione stesso. Da ciò è facile capire che le applicazioni più utili della spettrometria Raman sono quelle in cui si è interessati a caratterizzare le proprietà superficiali di un campione. La focalizzazione del laser sul campione è possibile attraverso un sistema ottico semplice (specchi e lenti) oppure attraverso un microscopio.

Le spettroscopie Raman e IR sono due tecniche tra loro complementari in quanto hanno regole di selezione differenti. Poiché una molecola mostri effetto Raman, la luce incidente deve indurre una variazione nella polarizzabilità della molecola durante la vibrazione (distorsione della nuvola elettronica della molecola). Potrà quindi accadere che bande assenti o poco intense in Raman siano intense in IR e viceversa; in particolare, nelle molecole con centro di simmetria, le transizioni permesse in Raman sono proibite in IR e viceversa. Un primo vantaggio della spettroscopia Raman è la possibilità di registrare spettri di soluzioni acquose, cosa quasi impossibile in IR, in quanto in IR l'acqua presenta forti assorbimenti mentre le sue bande Raman sono meno intense. Un altro vantaggio è che la spettroscopia Raman permette di analizzare in modo non invasivo e non distruttivo campioni solidi, liquidi o gassosi senza alcun trattamento preliminare del campione.

Anche in Raman si possono avere due tipi di strumentazioni, in analogia con quanto detto in precedenza a proposito dell'IR: dispersiva (costituita da una sorgente laser di luce monocromatica, una cella portacampione, un monocromatore ed un rivelatore), o a trasformata di Fourier, che utilizza un laser Nd³⁺:YAG. L'utilizzo di questo laser porta diversi vantaggi: permette di operare con potenze più elevate senza provocare la fotodecomposizione del campione, inoltre non provoca il fenomeno della fluorescenza in quanto non fornisce energia sufficiente per le transizioni elettroniche. I possibili inconvenienti risiedono invece nella diminuzione dell'intensità del segnale (che dipende dalla frequenza di emissione del laser) e dall'interferenza da parte dell'acqua.

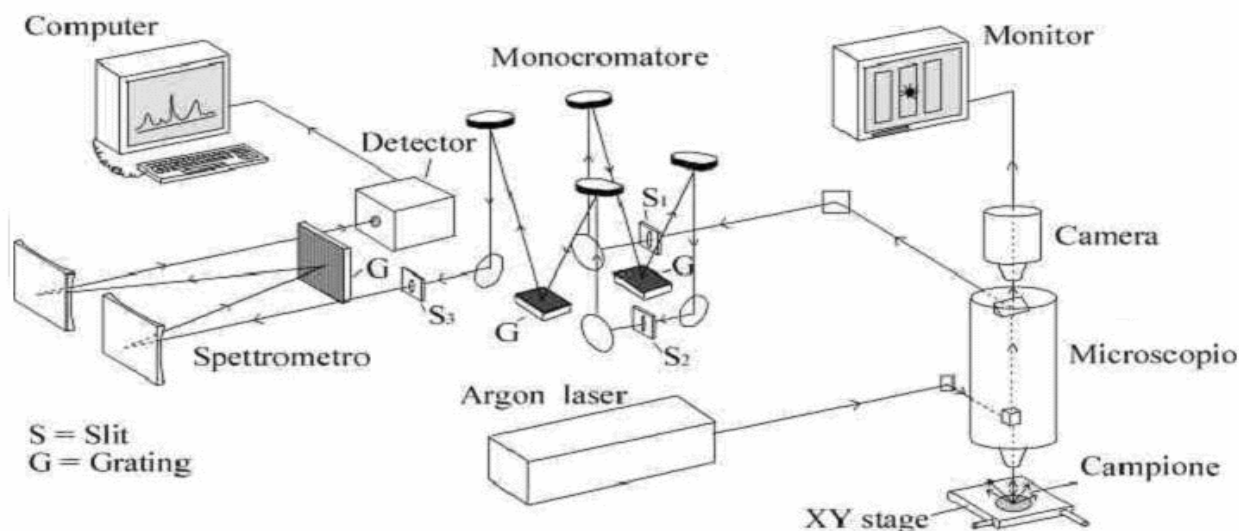


Figura 10: schema di uno spettrofotometro Raman dispersivo accoppiato ad un microscopio.

Quando la luce colpisce il campione, si osserva diffusione della luce in tutte le direzioni. La luce viene in genere raccolta a 90° o 180° rispetto alla radiazione incidente e focalizzata sul rivelatore.

La registrazione di uno spettro mediante uno spettrometro Raman dispersivo può richiedere tempi molto lunghi per la scansione di tutta la regione spettrale. Per questo, grazie all'introduzione dei rivelatori a multicanale (CCD), si sono sviluppati spettrometri dispersivi non a scansione in cui la registrazione dello spettro è molto più rapida. In più dall'unione di due diverse tecniche, la microscopia e la spettroscopia Raman, si è sviluppata la Microscopia Raman, in grado di focalizzare il laser su regioni di campione molto piccole (pochi micron) con un conseguente aumento dell'intensità del segnale e soprattutto con la possibilità di effettuare analisi puntuali di campioni disomogenei.

Nel presente lavoro di tesi, sono stati utilizzati tutti i tipi di spettrofotometro Raman descritti in precedenza. In particolare, gli spettri micro Raman sono stati ottenuti con uno strumento Jasco NRS-2000C dotato di microscopio con ingrandimenti di $10\times$, $20\times$, $50\times$ e $100\times$, utilizzando come linea eccitatrice un laser a 488 nm (Innova Coherent 70). Il detector è una CCD (Spec-10: 100B, Roper Scientific Inc.) raffreddata ad azoto liquido. Lo strumento è inoltre fornito di una video camera per l'ispezione visuale della superficie da analizzare.

Gli spettri FT-Raman sono stati registrati su uno spettrofotometro IFS-66 dotato di modulo Raman FRA-106, con detector di germanio raffreddato ad azoto liquido. La sorgente eccitatrice è un laser Nd^{3+} :YAG (1064 nm, con potenza massima sul campione di circa 100 mW) in configurazione backscattering (180°).

Infine, sono stati registrati anche spettri Raman con uno spettrofotometro dispersivo Jasco R1100, con sorgente laser ad argon Spectra-Physics a 488 nm.

B - TECNICHE DI ANALISI TERMICA

Le tecniche di analisi termica sono un gruppo di tecniche nelle quali una proprietà fisica di una sostanza viene misurata in funzione della temperatura, mentre la sostanza è sottoposta ad un trattamento termico (riscaldamento o raffreddamento) a temperatura controllata.

Le loro caratteristiche possono essere così riassunte: il campione può essere analizzato usando programmi di temperatura in condizioni dinamiche o isoterme; il campione può essere analizzato in qualsiasi forma, sia allo stato liquido, sia solido; è necessaria una piccola quantità di campione (pochi mg.); il tempo necessario per un'analisi varia da pochi minuti a qualche ora; è possibile controllare l'atmosfera in cui avviene la prova.

Le tecniche di analisi termica utilizzate in questo lavoro di tesi sono la termogravimetria (TG), in cui la proprietà fisica misurata è la massa del campione, e la calorimetria differenziale a scansione (DSC), nella quale invece si misura il flusso di calore.

I - Termogravimetria TG

In un'analisi termogravimetrica si misura la massa di un campione in atmosfera controllata in funzione della temperatura o del tempo, quando la temperatura del campione viene aumentata generalmente in maniera lineare. Un diagramma della massa o della percentuale della massa persa o acquistata in funzione del tempo è chiamato *termogramma*.

La termogravimetria permette quindi di studiare tutti quei processi che avvengono con variazione di massa come la decomposizione, la sublimazione, l'adsorbimento, il desorbimento e la vaporizzazione, mentre non possono essere studiate ad esempio la fusione e la cristallizzazione, in quanto non comportano variazioni nella massa del campione.

Il termogramma viene registrato utilizzando una termobilancia, costituita da: una bilancia analitica sensibile, una fornace e un sistema di gas di spurgo che assicura una atmosfera inerte (o talvolta reattiva).

Esistono numerosi e diversi modelli di termobalance in grado di fornire informazioni quantitative riguardo a campioni la cui massa è compresa tra 1 µg e 100 mg. A seconda della posizione relativa tra campione e fornace si hanno differenti tipi di strumenti, schematizzati in figura 11.

Il campione viene posto in un crogiolo; in commercio sono disponibili crogioli di diverse forme, dimensioni e materiali. Il materiale deve essere scelto in modo tale che non avvengano reazioni chimiche tra il crogiolo e il campione. In genere si usano crogioli in platino, alluminio, quarzo o allumina.

Lo strumento è calibrato in base alla transizione ferromagnetica di metalli standard (ad esempio il Nichel).

Le variabili che influenzano l'analisi sono molteplici. Alcune di queste sono: la velocità di riscaldamento, il calore di reazione, l'atmosfera della fornace, la quantità e le caratteristiche del campione.

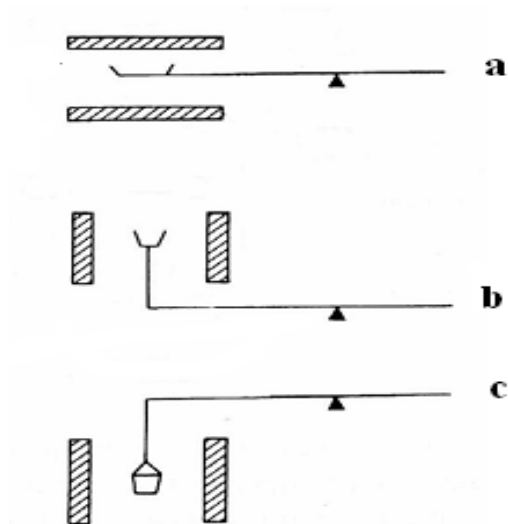


Figura 11: TG ad arrangement orizzontale (a), verticale con caricamento dall'alto (b) o con carico sospeso (c).

E' possibile visualizzare il termogramma in termini di derivata (DTG, figura 12) che permette di individuare la temperatura alla quale la variazione di massa è massima e di separare eventi molto vicini tra loro.

E' interessante sottolineare che è possibile accoppiare uno spettrofotometro IR ad una termobilancia in modo da analizzare i gas di decomposizione.

Nel presente lavoro di ricerca è stata utilizzata una termobilancia ad arrangement orizzontale TA-STAR, TGA/SDTA 851^e in aria, stabilizzata con un flusso costante di azoto a 60 mL/min.

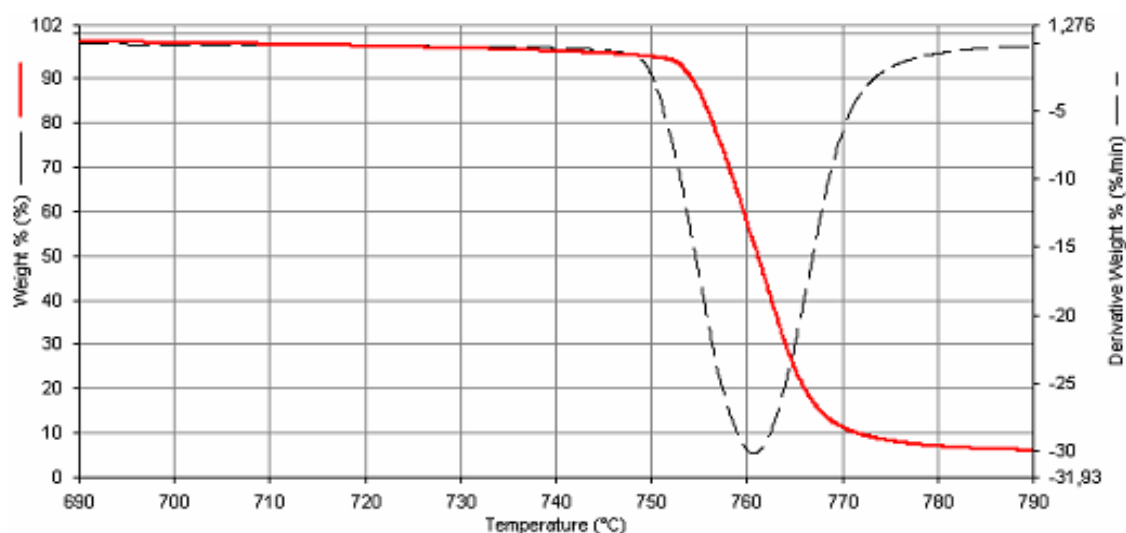


Figura 12: curva DTG (linea continua) associata ad una TG (tratteggio nero).

II - Calorimetria Differenziale a Scansione DSC

La calorimetria differenziale a scansione DSC è un metodo termico nel quale si misura la differenza tra i flussi termici nella sostanza in esame ed in un riferimento, mentre entrambi sono sottoposti ad un programma controllato di variazione della temperatura.

Quando in un composto chimico avviene un cambiamento di fase si ha sempre assorbimento od emissione di energia in quantità proporzionale al peso del campione in esame. La variazione energetica si presenta il più delle volte come effetto esotermico o endotermico. È importante sottolineare come la temperatura a cui avviene la variazione sia costante e caratteristica per ogni sostanza.

Il compito specifico della tecnica DSC è di quantizzare il calore in gioco nelle trasformazioni a cui è soggetto il campione. Questo avviene confrontando il campione in esame con un riferimento inerte: il sistema fornisce al campione, durante la trasformazione, la quantità di energia necessaria per mantenerlo alla stessa temperatura del riferimento. Ogni modificazione termica del sistema provoca uno squilibrio, che viene immediatamente corretto per ristabilire l'eguaglianza termica con il riferimento. L'energia elettrica necessaria per ristabilire l'equilibrio è la misura diretta dell'energia sviluppata o assorbita durante il processo. La quantità di calore (dq/dT) è misurata in funzione della temperatura.

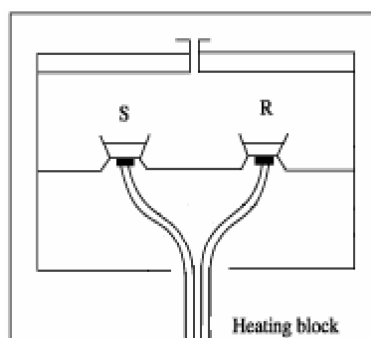


Figura 13: schema di DSC a flusso di calore; S: campione; R: riferimento.

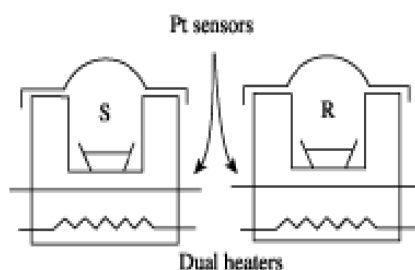


Figura 14: schema di un DSC a compensazione di calore.

Esistono due tipi principali di calorimetro DSC: a flusso di calore e a compensazione di calore. Il DSC a flusso di calore, schematizzato in figura 13, misura la differenza di calore tra il campione e il riferimento. Entrambi sono posti all'interno della medesima camera di misura, su una lastra sensibile caratterizzata da una resistenza nota. Questa lastra determina il flusso di calore dalla parete ai crogioli: tra i due compartimenti si instaura una differenza di temperatura dovuta alle differenti capacità termiche.

Nel calorimetro a compensazione di calore (figura 14) il campione e il riferimento sono mantenuti alla stessa temperatura da elementi riscaldanti distinti e il parametro misurato è la differenza nella fornitura di potenza ai due elementi. Sono inoltre presenti due distinte termocoppie in platino e le fornaci sono tenute separate. Lo strumento con cui sono state effettuate le misure DSC nel presente lavoro è di quest'ultimo tipo. I grafici ottenuti con i due diversi tipi di calorimetro sono uguali e riportano la differenza di calore (dq/dT) ad una data temperatura.

Un calorimetro DSC è solitamente calibrato con standard di elevata purezza, estremamente stabili e di cui si conosce alla perfezione il comportamento termico. Tra gli standard più usati ci sono metalli basso fondenti e che mostrano una fusione molto netta, ad esempio l'indio, o composti organici cristallini a basso peso molecolare (antracene).

I campioni (di circa 1-20 mg) sono depositati in crogioli di materiali inerti (allumina) o metallici (platino o alluminio). Il crogiolo può essere aperto o chiuso a seconda della possibile formazione di gas durante l'analisi. E' buona norma assicurarsi che il materiale in analisi sia in contatto con il fondo del crogiolo in modo da assicurare un buon contatto termico e scegliere un crogiolo adatto alla massa del materiale da analizzare per minimizzare gli effetti di ritardo nella conduzione termica.

Le variabili che influenzano l'andamento di un termogramma DSC sono molteplici. Alcune di queste sono: la velocità di riscaldamento, l'atmosfera di gas presente nella testa calorimetrica, la quantità e le caratteristiche chimico-fisiche del campione.

La velocità di riscaldamento ha un'elevata influenza sulla forma del picco, mentre la sua area totale rimane costante. Aumentando la velocità di riscaldamento aumenta l'altezza del picco mentre l'ampiezza diminuisce. Il motivo di questi cambiamenti va ricercato nel tempo finito richiesto per la conduzione di calore dalla cella al campione. Si può quindi affermare che un aumento di velocità di riscaldamento fa diminuire la risoluzione della misura (capacità di distinguere tra transizioni termiche vicine tra loro), ma fa aumentare la sensibilità in quanto si ottengono picchi più alti.

Se si compiono misure in atmosfera inerte di azoto non si hanno effetti sulla misura, mentre se si utilizza elio, a causa della sua elevata conducibilità termica, questo gas sottrae calore al campione. In atmosfera ossidante (O_2) è possibile anche osservare le trasformazioni di ossidazione dei campioni.

La geometria del campione ha effetti sull'aspetto qualitativo del termogramma e non su quello quantitativo, infatti analizzando la stessa quantità di uno stesso campione ma in uno stato differente (in granuli e in polvere) si ottengono picchi di forma diversa, ma con la stessa area.

Picchi stretti sono generalmente indice di elevata purezza del campione analizzato, mentre picchi allargati e a temperatura inferiore sono dovuti a campioni impuri.

Il peso del campione è importante nelle trasformazioni a basso contenuto energetico, dove per ottenere picchi misurabili possono occorrere anche molti milligrammi di campione.

Gli eventi termici si presentano nel termogramma come picchi o come inflessioni della linea di base a seconda della loro natura (figura 15): la transizione vetrosa è una transizione di secondo ordine, poiché presenta una discontinuità nella derivata della capacità termica (ovvero una discontinuità nella derivata seconda del calore rispetto alla temperatura). Al contrario, la fusione e la cristallizzazione sono transizioni di primo ordine perché presentano una discontinuità della derivata prima dell'energia libera rispetto alla temperatura. L'area sottesa dal picco di fusione rappresenta il calore necessario per fondere il materiale: dal confronto tra il valore ottenuto e il valore della letteratura per il materiale completamente cristallino, si può ottenere la percentuale di cristallinità del campione esaminato. La temperatura di transizione vetrosa è il punto mediano tra due rette parallele che si possono tracciare seguendo il termogramma prima e dopo la transizione.

Le misure DSC sono state effettuate con un calorimetro a compensazione di calore Mettler TA-STAR, DSC 821^e.

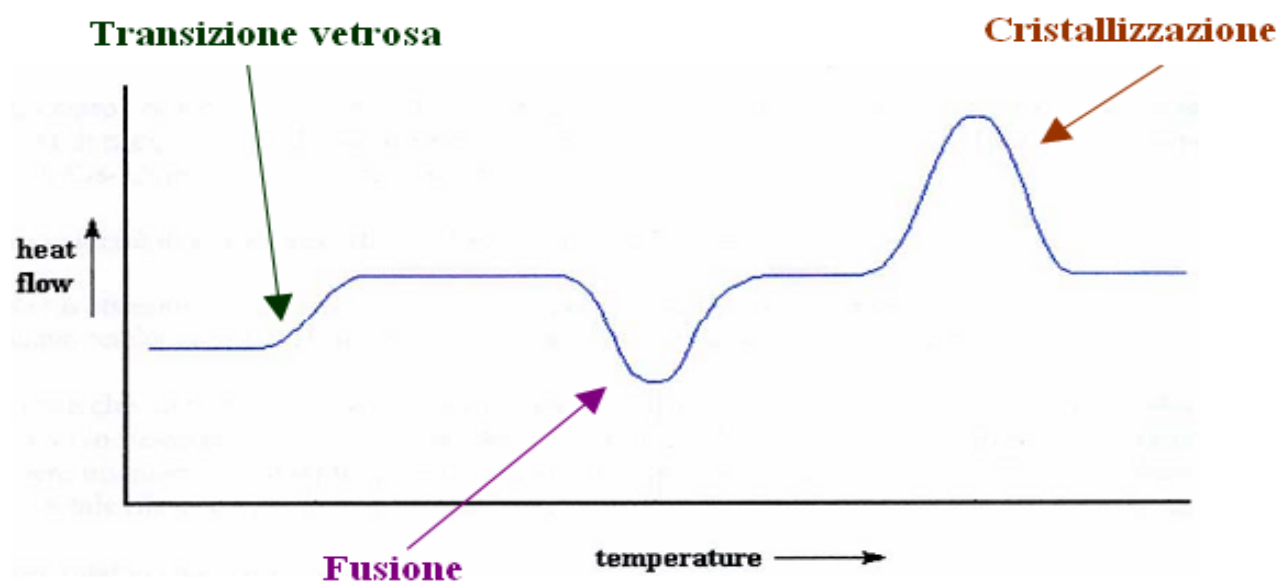


Figura 15: tipico termogramma DSC con le principali transizioni di fase.

Bibliografia

- AA VV. *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*. Theodofanides T, Reidel D ed, Publishing Company, Dordrecht (1984).
- AA VV. *Thermal Analysis Techniques and Applications*. Charsley E L, Warrington S B ed, Royal Society of Chemistry, Cambridge (1992)
- AA VV. *Handbook of Thermal Analysis*. Hatakeyama T, Liu Z ed, Wiley and Sons, New York (1998)
- Colthup N B, Daly L H, Wiberley S E. *Introduction to Infrared and Raman Spectroscopy*. Academic Press, New York (1964).
- McCreery R C. *Raman Spectroscopy for the Chemical Analysis*. Wiley-Interscience, New York (2000).
- Shrader B. *Infrared and Raman Spectroscopy*. Weinheim (1995).
- Silverstein R M, Bassler G C, Morrill T C. *Spectrometric identification of organic compounds*. Wiley and Sons, New York (1991).
- Tu A. *Raman Spectroscopy in biology*. Wiley and Sons, New York (1982).
- Campbell D, Pethrick R A, White J R. *Polymer Characterization*. CRC Press, New York (2000).
- Parker S F. *Applications of Infrared Raman and Resonance Raman Spectroscopy in Biochemistry*. Plenum Press, New York (1983).

PCL-PLLA

A - INTRODUZIONE

L'uso delle tecniche biomimetiche tese a riprodurre la matrice extracellulare per favorire e promuovere l'integrazione tra impianto e tessuti è un approccio largamente utilizzato in Tissue Engineering. La matrice extracellulare è una componente vitale e dinamica e agisce come supporto naturale per la morfogenesi di organi e tessuti. La sua struttura fibrillare è caratterizzata da fasci di collagene interpenetrati da una substrato di proteoglicani che guidano l'organizzazione cellulare. Per rendere dunque più fisiologico l'ambiente di crescita delle cellule, la ricerca di nuovi scaffold sintetici deve ispirarsi alla creazione di questo substrato 3-D [1].

Il poli(ϵ -caprolattone) (PCL) e l'acido poli-L-lattico (PLLA) sono stati ampiamente utilizzati negli ultimi anni in applicazioni biomediche per le loro capacità di biodegradarsi: il PLLA degrada infatti in acido lattico ed è stato impiegato per comporre fratture e nei sistemi di rilascio controllato di farmaci [2]; i prodotti di degradazione del PCL sono metabolizzati attraverso il ciclo degli acidi tricarbossilici o escreti attraverso i reni. Il PCL è stato utilizzato in sistemi per il rilascio dei farmaci [3], per suture e scaffold per Tissue Engineering [4]. Negli ultimi anni, è stato pubblicato un nutrito numero di articoli riguardante i copolimeri (di diversa morfologia e composizione) di PCL/PLLA [5-8]; tuttavia nel presente studio, i due polimeri sono presenti in fasi distinte (fibre di PLLA e matrice di PCL) per ottenere un materiale composito con caratteristiche morfologiche definite e in grado di influenzare la velocità di degradazione e l'interazione con i tessuti viventi e alternativo ai compositi polimero-ceramica. Infatti la presenza di fibre integrate nella matrice polimerica mima la disposizione spaziale della matrice extracellulare e aiuta la matrice a sostenere gli sforzi, migliorandone le proprietà meccaniche. Inoltre studi recenti hanno dimostrato che scaffold fibrosi possono stimolare le funzioni cellulari attraverso specifiche interazioni [9-12].

I compositi di PCL-PLLA sono stati immersi in diverse soluzioni acquose e analizzati a diversi tempi di degradazione con spettroscopia Micro-Raman e tecniche calorimetriche (termogravimetria TG e calorimetria differenziale a scansione DSC) per caratterizzarne la cinetica e il meccanismo di degradazione *in vitro*. Le stesse tecniche sono state utilizzate per caratterizzare i compositi incubati con cellule MSC (Marrow Stromal Cells) e HOB (Human OsteoBlasts) ricavate da pazienti di ortopedia, per valutare il ruolo delle cellule nella degradazione e le proprietà osteoconduttive del materiale. Come sottolineato da alcuni autori, infatti, le cellule primarie, sebbene proliferino con velocità inferiori rispetto alle linee cellulari, sono molto sensibili alla geometria dello scaffold. [9] Le tecniche spettroscopiche accoppiate all'analisi termica sono già state impiegate con successo nella caratterizzazione della degradazione di polimeri degradabili impiegati in medicina [13-17]. Infatti, essendo sensibile alle vibrazioni dei legami, la spettroscopia micro-Raman può dare informazioni sulla struttura molecolare (conformazione delle catene polimeriche e cristallinità) dei campioni e sulle sue variazioni durante la degradazione. Nell'analisi termogravimetrica, la massa di

una sostanza è misurata in funzione della temperatura, mentre essa è sottoposta ad una variazione controllata di temperatura; questa tecnica è stata usata per determinare la composizione del composito (cioè le percentuali in peso di PCL e PLLA presenti nel campione) prima e dopo la degradazione. La tecnica DSC è stata utilizzata per analizzare la morfologia delle componenti polimeriche e la sua eventuale variazione durante la degradazione.

Il materiale analizzato, costituito da fibre di PLLA disperse in una matrice di PCL, rappresenta una novità non solo dal punto di vista chimico-fisico rispetto ai precedenti scaffold costituiti da copolimeri di PCL-PLLA, ma anche sotto il profilo applicativo in quanto il materiale è fortemente anisotropo: gli studi preliminari mostrano che la proliferazione e rigenerazione tissutale avviene lungo le fibre di PLLA (figura 1).

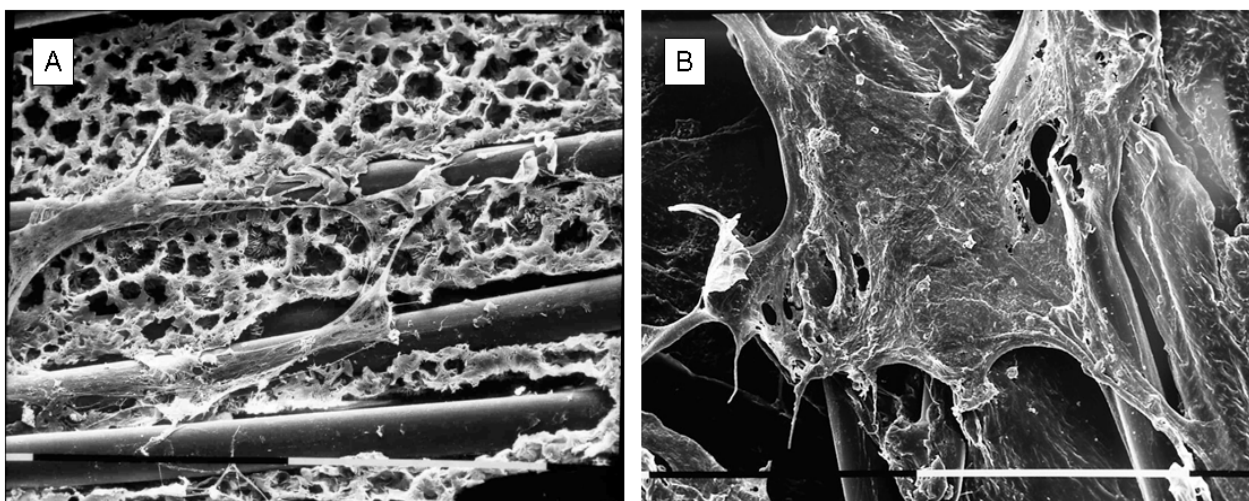


Figura 1: immagini SEM (barra 5 µm) che mostrano la proliferazione delle cellule lungo le fibre di PLLA (risultati ancora non pubblicati).

B - MATERIALI E METODI

I compositi sono stati sintetizzati presso l'Istituto per la Tecnologia dei Materiali Compositi del CNR, in collaborazione con il Centro Interdisciplinare sui Biomateriali dell'Università di Napoli. I compositi sono in forma di cilindri cavi (figura 3 A) costituiti da fibre di PLLA disperse in una matrice di PCL (figura 3 B). Le fibre di PLLA (Sigma Aldrich, 75 D-tex) sono state impregnate in un bagno contenente PCL (Sofradim, PM 65 kDa), dimetilacetamide (J T Baker) e cloruro di sodio (Fluka, con dimensioni controllate 300-500 µm) per 3 ore a 58°C. Le fibre sono state filate da una filatrice (AS LAB 101 TELMEC) con un angolo di 45°C su un mandrino di acciaio rivestito di teflon. Il solvente è stato in seguito rimosso con etanolo, mentre il sale è stato eliminato con acqua. Le cellule MSC (Marrow Stromal Cells) e HOB (Human OsteoBlast) sono state ottenute durante una procedura chirurgica di sostituzione totale di anca e sono state coltivate sui compositi per 4

settimane in α -MEM (Minimum Essential Medium Eagle) con il 10% di FBS (Fetal Bovine Serum).

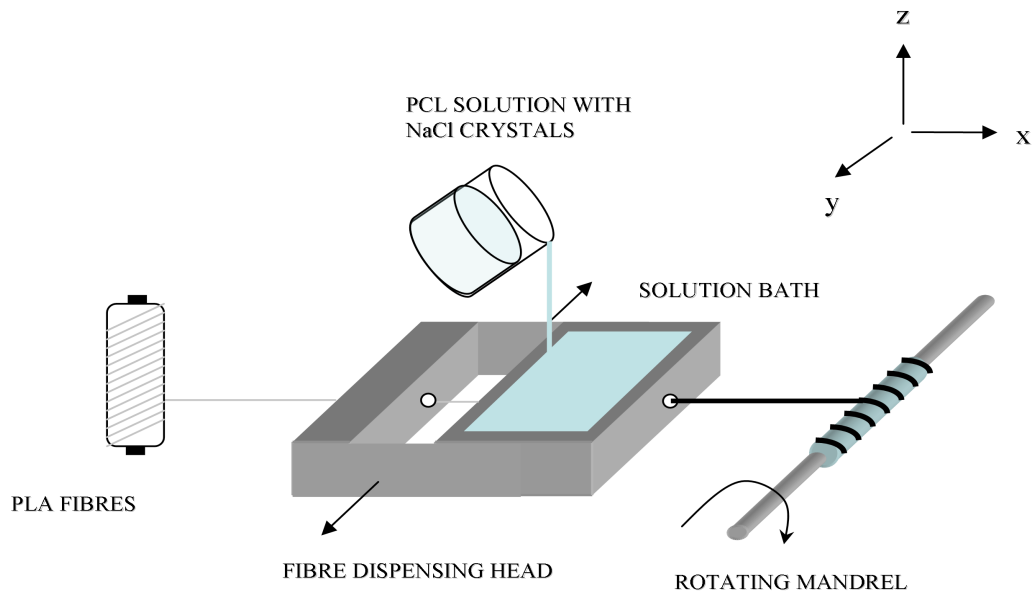


Figura 2: schema della sintesi dei compositi.

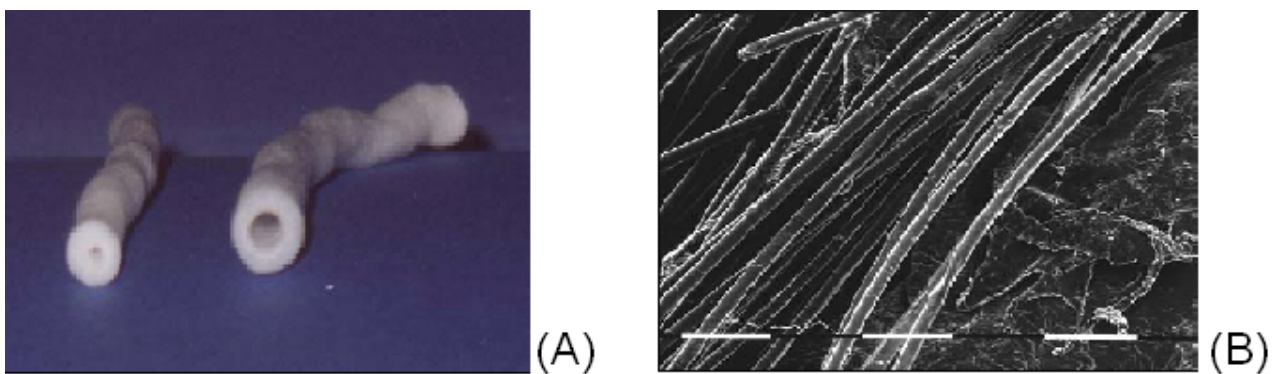


Figura 3: (A) forma finale dei campioni analizzati; (B) immagine SEM del composito, in particolare delle fibre di PLLA (barra: 10 μ m)

I - Degradazione in vitro

I compositi sono stati pesati prima della degradazione e successivamente immersi in quattro differenti soluzioni acquose a 37°C: tampone fosfato salino (Phosphate Buffer Saline, PBS) a pH 7.5 (KH_2PO_4 0.0087 M, Na_2HPO_4 0.0304 M e NaCl 0.154 M); soluzione 0.01 M di NaOH ; soluzione Simulated Body Fluid (SBF) tamponata a pH 7.5 con Tris 50 mM, HCl 45 mM, e contenente: Na^+ (142 mM), K^+ (4 mM), Ca^{2+} (2.5 mM), Cl^- (148.8 mM), HCO_3^- (4.2 mM), HPO_4^{2-} (1 mM) [20]; soluzione enzimatica ottenuta dissolvendo 5 mg di Esterasi (Esterase EC 3.1.1.1 da fegato suino, polvere, 41 unità/mg di solido, Sigma) in 25 mL di PBS a pH 7.5. Per ogni soluzione sono state effettuate prove in duplicato. I campioni sono stati sterilizzati con etanolo prima di essere immersi nella soluzione di degradazione. Le soluzioni di NaOH , PBS e SBF sono state autoclavate per 20 minuti prima dell'uso e rinnovate ogni settimana (per mantenerne costante l'attività). Le soluzioni enzimatiche sono state rinnovate ogni 24 ore, per mantenere costante l'attività enzimatica. Ogni sette giorni i campioni sono stati prelevati dalle soluzioni, lavati con acqua distillata, essiccati sotto vuoto a temperatura ambiente e infine pesati prima di essere sottoposti alle analisi termiche e spettroscopiche.

La percentuale di perdita di peso dei campioni è stata calcolata secondo la seguente equazione:

$$\% \text{ perdita peso} = 100 (w_0 - w_t) / w_0 \quad (1)$$

w_t : peso al tempo di degradazione t

w_0 : peso iniziale

II - Spettroscopia micro-Raman

I campioni sono stati caratterizzati con uno strumento Jasco NRS-200C dotato di microscopio con obiettivo 100× (per maggiori dettagli sulla strumentazione, consultare il capitolo Tecniche di Analisi). Gli spettri sono stati registrati con risoluzione di 5 cm^{-1} utilizzando come linea eccitatrice un laser Argon-Neon a 488 nm e potenza di 10 mW sul campione. L'utilizzo del microscopio si è reso necessario per analizzare in modo separato le due diverse componenti polimeriche presenti nel composito. Il diametro del laser sul campione è infatti di circa $1 \mu\text{m}$, ordine di grandezza confrontabile con lo spessore delle fibre di PLLA.

A causa dell'orientazione intrinseca delle fibre all'interno del composito, gli spettri del PLLA sono stati registrati in due configurazioni ottiche che differiscono per la direzione del piano di polarizzazione della luce laser incidente, come riportato in figura 4.

Sperimentalmente, la rotazione del piano di polarizzazione della radiazione incidente è stata ottenuta con una lamina a mezz'onda posta prima del campione. La lamina a mezz'onda permette la rotazione del piano del campo elettrico della luce incidente polarizzata. Per ottenere un campo elettrico polarizzato ortogonalmente rispetto alla radiazione incidente occorre ruotare la lamina di 45° . Secondo la nomenclatura di Damen-Porto [21], la geometria della luce polarizzata può essere descritta con una notazione di 4 lettere del tipo: A(BC)D, in cui A è la direzione del laser, B la sua

polarizzazione, C la direzione di polarizzazione dell'analizzatore e D la direzione di raccolta della luce scatterata. Secondo questa notazione, la configurazione A ha una geometria X(YY)X (indicata YY per semplicità) e la configurazione B ha geometria X(ZY)X (ZY per semplicità).

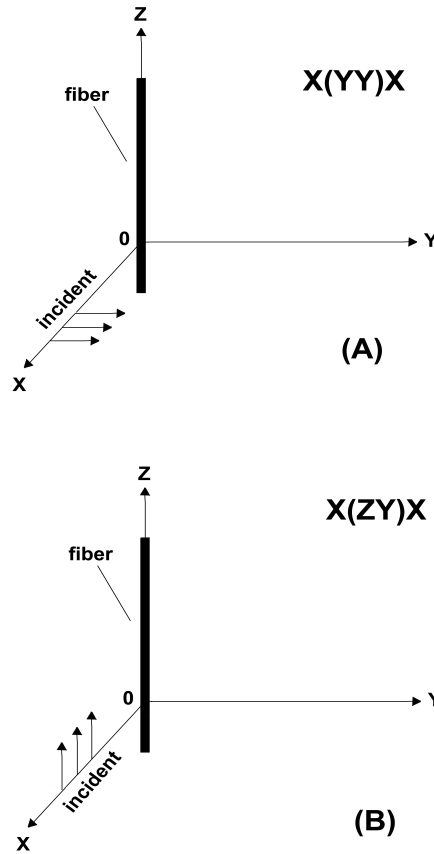


Figura 4: Configurazioni ottiche utilizzate nella registrazione degli spettri micro-Raman delle fibre di PLLA. Le frecce indicano la polarizzazione della luce laser incidente. La radiazione uscente è stata raccolta nella stessa direzione della luce incidente (asse X).

Per analizzare il grado di orientazione della catena di PLLA all'interno delle fibre, è stato calcolato il rapporto di depolarizzazione R di alcune bande opportunamente scelte. Il rapporto di depolarizzazione è il rapporto tra le intensità (espressa come altezza del picco) di una banda nelle due configurazioni. Nel nostro caso:

$$R = I_{ZY} / I_{YY} \quad (2)$$

I_{ZY} : altezza del picco in configurazione A

I_{YY} : altezza del picco in configurazione B

III - Analisi termiche

Le misure di termogravimetria, prima e dopo la degradazione, sono state ottenute riscaldando il composito a 2°C/min da 25 a 600°C. Le percentuali in peso dei due polimeri sono state ottenute dalla derivata prima della curva termogravimetrica (figura 5 A), in accordo con altri autori [22]. Le frazioni di PLLA e PCL sono state determinate nelle regioni di temperatura 200-330°C e 330-420°C rispettivamente.

Le misure DSC sono state effettuate in atmosfera protetta di azoto (per evitare la decomposizione del PLLA ad elevate temperature) con flusso di 60 mL/min, riscaldando i campioni da 5 a 200°C alla velocità di 2°C/min, poi raffreddando con la medesima velocità per ritornare alla temperatura di partenza, infine si è ripetuta la prima scansione. Un tipico termogramma del composito presenta 2 picchi di fusione, uno per ogni componente polimerico (figura 5 B), osservabili nel primo e nel terzo run. Nel secondo run si osserva un unico picco di cristallizzazione dovuto forse alla formazione di un'unica fase cristallina. Dall'area sottesa da ognuno dei picchi di fusione del primo run è stato calcolato il grado di cristallinità $X_c\%$ delle due componenti polimeriche secondo le seguenti equazioni:

$$X_{c, PCL} \% = 100 (\Delta H_{m, PCL} / \Delta H_{m, PCL}^{\circ}) \quad (3)$$

$$X_{c, PLLA} \% = 100 (\Delta H_{m, PLLA} / \Delta H_{m, PLLA}^{\circ}) \quad (4)$$

$\Delta H_{m, PCL}$, $\Delta H_{m, PLLA}$: entalpie di fusione misurate per PCL e PLLA

$\Delta H_{m, PCL}^{\circ}$, $\Delta H_{m, PLLA}^{\circ}$: entalpie di fusione del PCL e del PLLA totalmente cristallini ($\Delta H_{m, PCL}^{\circ} = 139$ J/g [23]; $\Delta H_{m, PLLA}^{\circ} = 93.6$ J/g [24]).

Nel calcolo di $X_{c, PCL} \%$ e $X_{c, PLLA} \%$, i $\Delta H_{m, PLLA}$ e $\Delta H_{m, PCL}$ sono stati calcolati in base alle masse di PCL e PLLA calcolate con la termogravimetria.

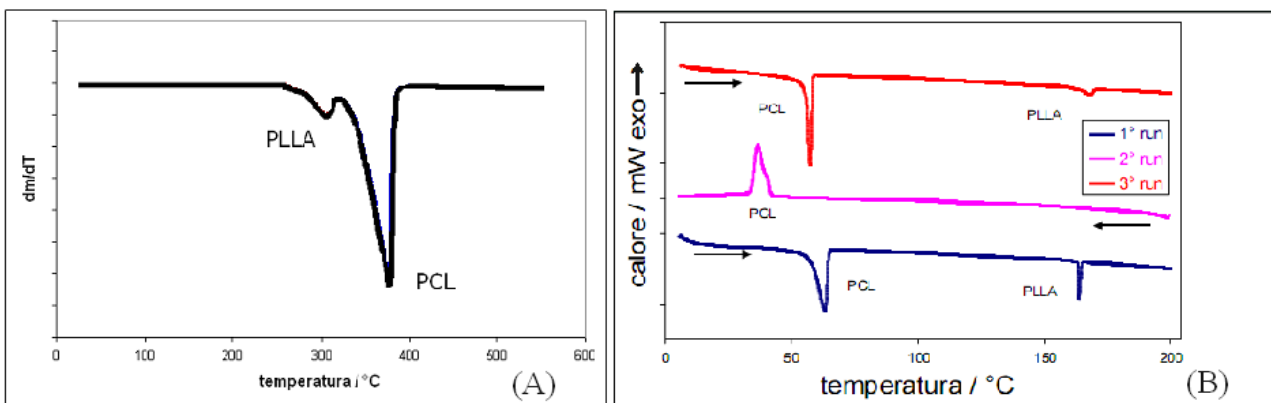


Figura 5: tipico termogramma DTG (A) e scansione DSC (B) dei compositi.

C - RISULTATI E DISCUSSIONE

I - Degradazione in vitro: variazioni di peso

In figura 6 è riportato l'andamento della perdita di peso % dei campioni di PCL-PLLA nei diversi mezzi in funzione del tempo di degradazione. Come si può vedere, dopo 56 giorni di degradazione, la perdita di peso più rilevante (circa il 25%) è stata osservata in NaOH, mentre non sono state rilevate variazioni significative in PBS, SBF e soluzione enzimatica. Questo risultato era prevedibile in quanto l'effetto catalitico degli ioni OH^- nella degradazione dei poliesteri alifatici è stato ampiamente descritto in letteratura [13-17, 25-26]. L'andamento delle curve riportato in figura 6 è in accordo con i risultati ottenuti da altri gruppi di ricerca [15, 16, 25]. Per quanto riguarda la degradazione in PBS, la perdita di peso in funzione del tempo segue un andamento sigmoidale [15, 16]: dopo 56 giorni di degradazione in questo mezzo, i campioni analizzati sono ancora nella fase iniziale, cioè con perdite di peso molto basse (<1%). Anche i campioni immersi in SBF mostrano lo stesso comportamento, in disaccordo con i risultati ottenuti da Chen et al [27] su poli(α -idrossiacidi): questi autori hanno notato la formazione di un ricoprimento apatitico su PLLA e PGA dopo 24 ore se immersi in una soluzione di SBF con forza ionica di 5 volte superiore a quella del plasma umano; nei campioni da noi esaminati i metodi spettroscopici non hanno evidenziato nessuna deposizione di fase apatitica dopo 56 giorni, nonostante un leggero aumento di peso nella prima parte della degradazione lo avesse fatto ipotizzare.

L'andamento osservato in NaOH è più complesso rispetto agli altri mezzi: si è infatti osservata una diminuzione di peso quasi lineare nei primi 56 giorni, in accordo con altri studi [15, 16, 25]. Infatti, Cam et al [25] riportano che campioni di PLLA a diverso peso molecolare perdono il loro peso in maniera pressoché lineare per circa 100 giorni, dopo i quali la velocità di degradazione diminuisce sensibilmente. Gli autori hanno interpretato questi risultati ipotizzando la presenza di canali che permettono ai prodotti di degradazione di lasciare la massa del polimero subito dopo la loro formazione.

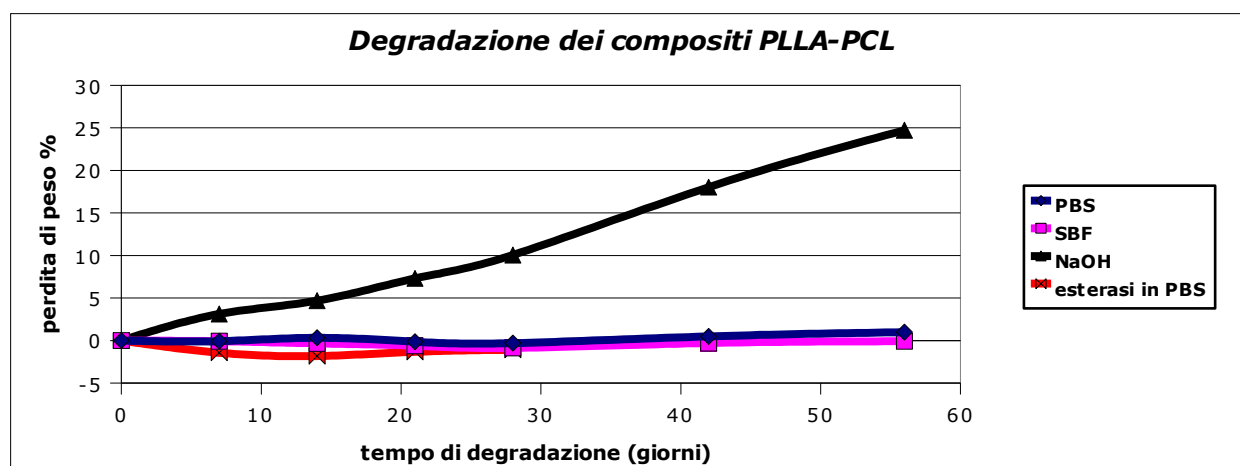


Figura 6: perdite di peso dei compositi nelle differenti soluzioni di degradazione.

E' interessante notare che i campioni immersi in soluzione enzimatica hanno esibito un piccolo aumento di peso. Vert et al [28] hanno descritto la degradazione di PLLA in esterasi in condizioni simili e hanno trovato che i campione mostravano una diminuzione di peso a partire dall'ottava settimana di degradazione: è stato ipotizzato che all'inizio la degradazione non coinvolgesse gli enzimi (idrolisi semplice), ma che gli enzimi potevano adsorbirsi sulla superficie del materiale; in seguito, con l'aumento dell'erosione e della frammentazione del polimero, l'attività enzimatica diventava più rilevante.

II - Analisi termiche

In tabella 1 si riportano i dati ottenuti dalla TG e dal DSC dei campioni prima e dopo la degradazione. Come si può osservare, i campioni non degradati contengono l'85% in peso di PCL (con cristallinità del 67%) e il 15% di PLLA (con cristallinità del 64%), in accordo con le percentuali usate durante la sintesi.

Non sono stati osservati rilevanti cambiamenti di composizione e di morfologia durante la degradazione in PBS e SBF, anche dopo 56 giorni di degradazione; lo stesso vale per la degradazione in soluzione enzimatica. Altri autori [26] avevano invece osservato una maggiore diminuzione della lunghezza di catena e un maggiore aumento di cristallinità dovuti all'azione della proteinasi K rispetto alla semplice idrolisi in ambiente alcalino. Dopo 56 giorni di degradazione in ambiente basico, la percentuale in peso di PCL è notevolmente aumentata (da 85 a oltre 95%), suggerendo una degradazione preferenziale della componente di PLLA, più idrofilica rispetto al PCL (confronta anche la struttura chimica dei monomeri). Contemporaneamente, la cristallinità di entrambi i componenti è aumentata, soprattutto per quanto riguarda il PLLA: infatti è noto che nei polimeri semicristallini la degradazione inizia nelle zone amorfe in quanto l'acqua vi penetra con maggiore facilità [29], facendo aumentare il grado di cristallinità del polimero. La variazione di cristallinità del PCL è risultata notevolmente inferiore a quella osservata in campioni di polimero puro ottenuto con analoghi procedimenti (cfr. capitolo sui compositi PCL-HA). Non è stato possibile calcolare la cristallinità delle due componenti polimeriche dopo 56 giorni in NaOH poiché il contenuto di PLLA è inferiore al limite di rilevabilità della termogravimetria: non potendo calcolare la massa dei polimeri, non è possibile calcolare le entalpie di fusione (eq. 3 e 4).

Purtroppo, l'analisi termica dei campioni incubati con le cellule primarie non ha permesso una stima accurata della cristallinità e della composizione dei campioni a causa della presenza di residui dei reagenti utilizzati durante i test di osteoconduttività.

CAMPIONE	% PCL (w/w)*	% Xc PCL**	% PLLA (w/w)*	%Xc PLLA***
Non degradato	85	67	15	64
NaOH 28 gg	91	70	9	69
NaOH 56 gg	> 95	/	< 5	/
PBS 28 gg	87	66	13	65
PBS 56 gg	88	67	12	66
SBF 28 gg	83	67	17	64
SBF 56 gg	84	69	16	64
Esterasi 28 gg	86	69	14	67

*Tabella 1: composizione e cristallinità dei compositi PCL-PLLA dopo 28 e 56 giorni di immersione nei differenti mezzi di degradazione. * calcolata da termogravimetria; ** calcolata da eq. (3); *** calcolata da equazione (4).*

III - Analisi micro-Raman

a - fibre di PLLA

In figura 7, vengono riportati gli spettri Raman della fibre di PLLA prima della degradazione, registrati nelle due diverse configurazioni YY (a) e ZY (b). In accordo con la letteratura [30, 31], i due spettri differiscono in maniera consistente a causa dell'elevato grado di orientazione delle fibre. Le maggiori differenze tra le due modalità di analisi si osservano nelle regioni spettrali riportate in tabella 2.

Per effetto della degradazione, gli spettri Raman registrati con geometria YY mostrano cambiamenti inferiori rispetto a quelli con geometria ZY. Come esempio si mostra in figura 8A lo spettro in geometria YY prima e dopo degradazione in NaOH: le maggiori differenze riguardano l'aumento di intensità della banda a 923 cm^{-1} , la comparsa della banda a 523 cm^{-1} e l'aumento della separazione dei doppietti a $412\text{-}398$ e $315\text{-}297\text{ cm}^{-1}$. Queste bande sono le più sensibili alle variazioni nell'ordine strutturale, come già osservato in letteratura [30-33].

A questo proposito, l'area della banda a 412 cm^{-1} , normalizzata rispetto alla banda a 875 cm^{-1} (insensibile alla variazione di cristallinità), aumenta con l'aumento di cristallinità del PLLA [31]. Infatti il rapporto A_{412}/A_{875} (figura 9 B) è aumentato da 0.8 a 1.2 dopo 28 giorni in NaOH, mentre è rimasto costante negli altri mezzi di degradazione in accordo con i dati calorimetrici. La banda a 412 cm^{-1} , inoltre, si allarga di 4 cm^{-1} (figura 9 C, FWHM) dopo la degradazione in ambiente alcalino, restando invece inalterata negli altri mezzi di degradazione. Questo aumento è dovuto all'aumento di intensità della banda a 398 cm^{-1} e può essere spiegato in relazione ai cambiamenti

osservati negli spettri in configurazione ZY nella regione intorno a 700 cm^{-1} . In figura 8 B, si può osservare che la banda a 710 cm^{-1} aumenta di intensità rispetto alla componente a 736 cm^{-1} . Queste due bande sono tipiche rispettivamente delle eliche 10_3 e 3_1 [30], cioè delle principali strutture cristalline formate dal PLLA [32-34]. Anche altre bande subiscono notevoli variazioni (figura 8B) dovute all'aumento della cristallinità delle fibre di polimero.

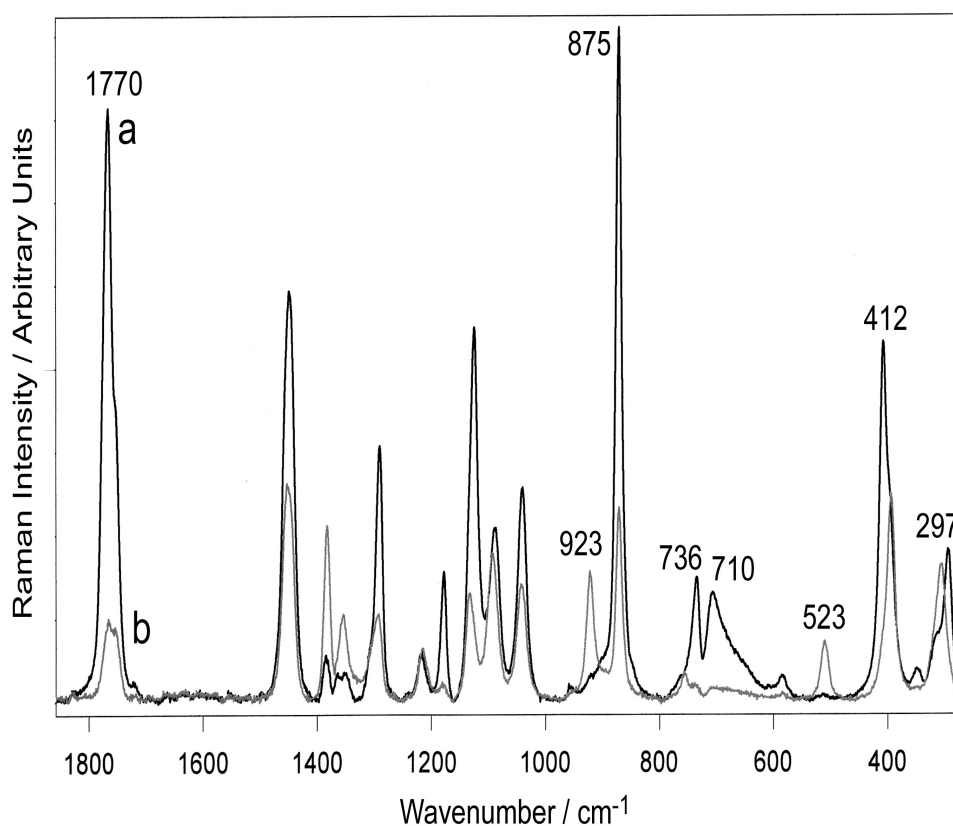


Figura 7: spettri Raman delle fibre di PLLA non degradate nelle due configurazioni geometriche YY (a) e ZY (b). L'assegnazione delle bande è riportata in tabella 2.

Infatti i rapporti di intensità relativa I_{875}/I_{923} e I_{1050}/I_{1103} (figure 9 F e 9 G rispettivamente) aumentano con il progredire della degradazione (e stanno ad indicare un aumento della cristallinità del polimero): l'aumento più significativo si osserva in condizioni alcaline; al contrario è piccolo dopo degradazione in PBS, SBF e mezzo di coltura (CTRL), mentre si può affermare che i campioni incubati con HOB e MSC hanno subito un notevole riarrangiamento, sebbene inferiore rispetto a NaOH. Andamenti e risultati analoghi sono stati osservati nei rapporti di depolarizzazione delle bande a 1770 cm^{-1} e a 875 cm^{-1} (R_{1770} e R_{875}) mostrati nelle figure 9 D e 9 E e nel rapporto tra le intensità relative tra le bande a 875 e a 1459 cm^{-1} (figura 9 A). Quest'ultima banda è attribuibile al bending dei gruppi CH_3 [30-33] e può essere considerata uno standard interno. Infatti in studi precedenti su fibre di PLLA utilizzati in ortopedia e periodontologia, il rapporto I_{875}/I_{1459} è stato

utilizzato come indicatore della lunghezza della catena polimerica [14, 16]. Nei campioni di composito, dopo degradazione in NaOH si è osservata una diminuzione di questo rapporto da 1.6 a 1.2, corrispondente quindi ad una sensibile diminuzione della lunghezza di catena, mentre per i campioni incubati con HOB e MSC si sono osservati i valori di 1.5 e 1.4, confermando gli andamenti precedentemente osservati.

ASSEGNAZIONE	NUMERO D'ONDA
δ CCO scheletro	$\sim 300 \text{ cm}^{-1}$ [29-31]
δ C=O sul piano	$\sim 400 \text{ cm}^{-1}$ [29-31]
δ CCO scheletro	523 cm^{-1} [29]
δ C=O fuori dal piano	$\sim 700 \text{ cm}^{-1}$ [29]
ν CCO	875 cm^{-1} [29-31]
ρ CH ₃	923 cm^{-1} [29]
ν C=O	1770 cm^{-1} [29-31]

Tabella 2: principali variazioni nelle bande osservate negli spettri micro-Raman delle fibre di PLLA nelle due diverse polarizzazioni.

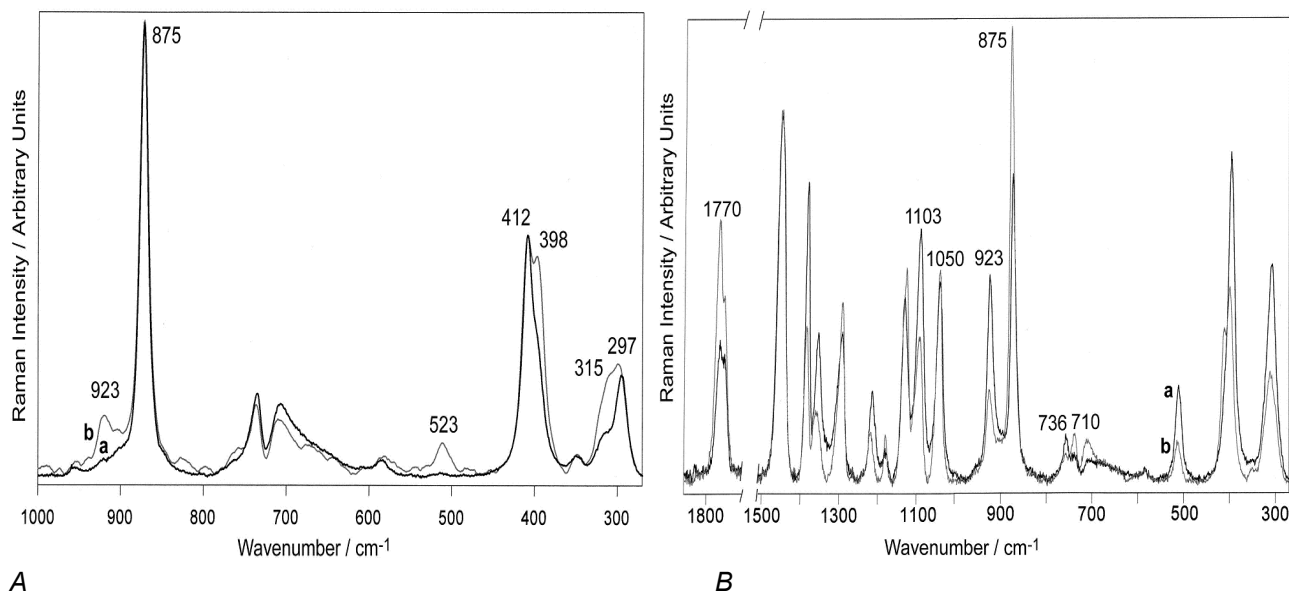


Figura 8: A: spettri in configurazione YY della fibra di PLLA prima (a) e dopo degradazione in NaOH per 28 giorni; gli spettri sono normalizzati sulla banda a 875 cm^{-1} , insensibile alla variazione di cristallinità. B: spettri della fibra di PLLA in configurazione ZY prima (a) e dopo degradazione in NaOH per 28 giorni(b); gli spettri sono normalizzati rispetto alla banda a 1459 cm^{-1} .

Si può concludere che dopo 28 giorni tutti i rapporti di intensità analizzati e le larghezze di bande selezionate indicano che la degradazione è maggiore in NaOH, come già ricavato dall'analisi termica; inoltre i campioni incubati con cellule primarie mostrano una degradazione superiore ai campioni immersi in soluzione di PBS, SBF e esterasi (che mostrano variazioni piccole), in particolare le MSC sembrano indurre una maggiore degradazione rispetto alle HOB.

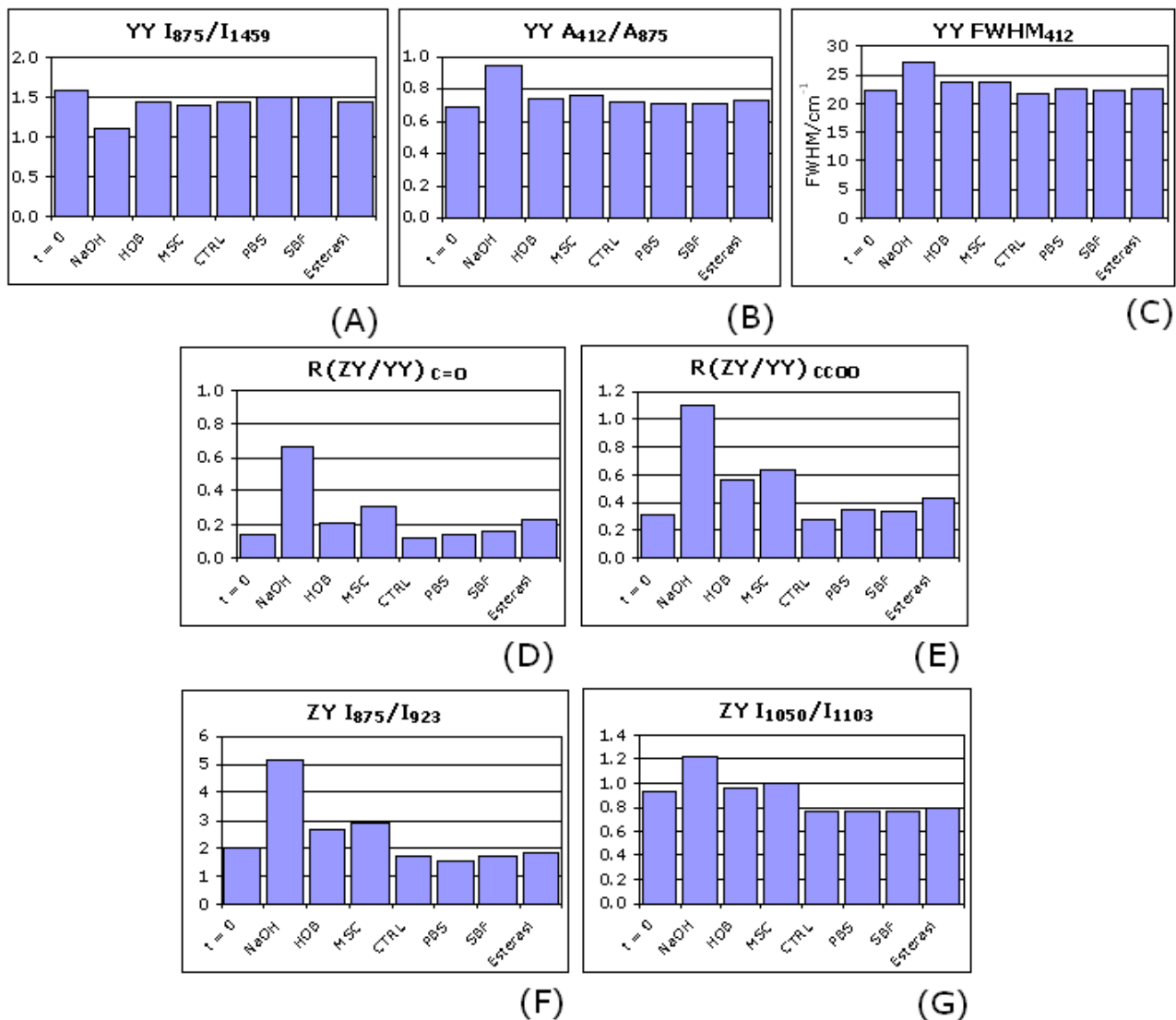


Figura 9: confronto di rapporti di intensità e larghezza di bande marker della degradazione del PLLA dopo 28 giorni. Le attribuzioni delle bande e il significato dei rapporti di intensità sono spiegati nel testo.

Dopo 56 giorni di degradazione in tre mezzi selezionati (NaOH, PBS e SBF), gli andamenti osservati precedentemente sono meno evidenti. Infatti si può affermare che in PBS e SBF la degradazione procede lentamente, ma in maniera continua (anche questo risultato è in accordo con i dati termici), mentre in NaOH, solo alcuni indicatori mostrano un aumento della degradazione rispetto a 28 giorni (I₈₇₅/I₁₄₅₉ in figura 10A e R₈₇₅ in figura 10 E), mentre tutti gli altri mostrano un

andamento sostanzialmente stabile o in leggera diminuzione rispetto a quanto osservato dopo 28 giorni. Questo comportamento mostra che I_{875}/I_{1459} e R_{875} sono i parametri più sensibili alla variazione della lunghezza di catena e della cristallinità; non a caso sono anche quelli che mostrano i cambiamenti più significativi dopo 28 giorni di degradazione. Gli altri dati utilizzati come indicatori della degradazione si sono rivelati più sensibili all'errore sperimentale: un esame visivo delle fibre al microscopio ottico ha infatti evidenziato una diminuzione del diametro delle fibre, in accordo con il fatto che gli spettri risultanti mostrano infatti un rumore di fondo maggiore e una minore intensità delle bande.

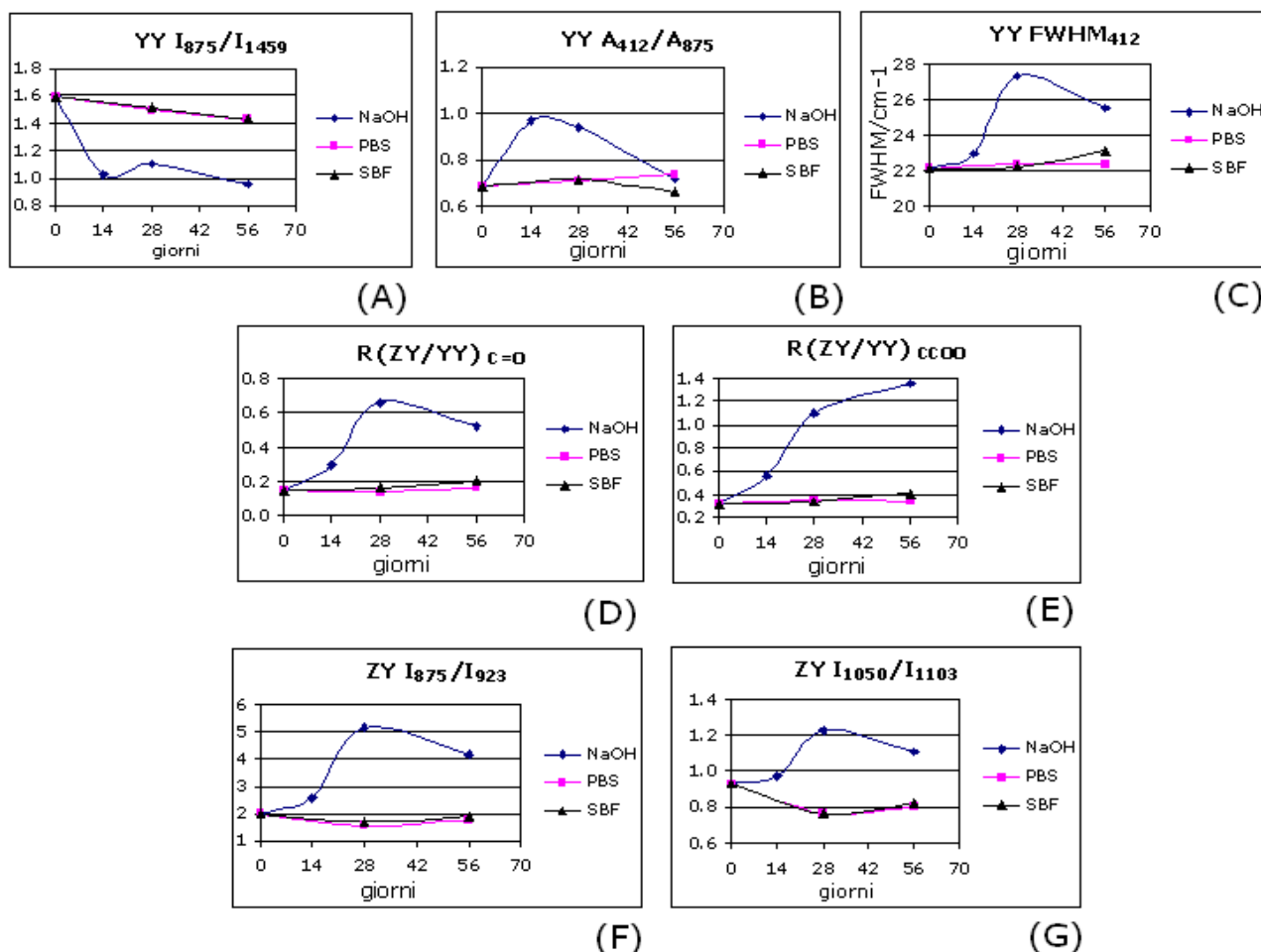


Figura 10: andamenti delle bande tipiche della degradazione del PLLA dopo 56 giorni in PBS, SBF e NaOH.

b – matrice di PCL

Come già osservato nella sezione relativa all'analisi termica, la matrice di PCL subisce minori modifiche morfologiche: infatti l'analisi di alcuni parametri spettroscopici di bande marker [18-19, 36] del PCL ha evidenziato che dopo 28 giorni di degradazione non si sono avute variazioni di rilievo nella struttura polimerica (figura 11). Tali variazioni sono tutte inferiori all'errore sperimentale. Le bande sensibili alla variazione di cristallinità del PCL sono indicate in tabella 3 ed

evidenziate negli spettri micro-Raman di figura 11. La banda a 1730 cm^{-1} ($\nu\text{ C=O}$) sottende due componenti, una a numeri d'onda inferiori (1725 cm^{-1}), relativa alla vibrazione dei domini cristallini, l'altra a 1735 cm^{-1} , relativa ai domini amorfi. Un aumento della larghezza di questa banda è indice di aumento della componente amorfa del polimero. Un'altra banda marker della cristallinità è la vibrazione dello scheletro della catena polimerica a 1110 cm^{-1} , poiché anche essa è formata da due componenti (1110 cm^{-1} , cristallino e 1090 cm^{-1} , amorfo): l'allargamento di questa banda è provocato dall'aumento del disordine strutturale. Infine le bande che costituiscono il doppietto del $\omega\text{ CH}_2$ a 1310 e 1285 cm^{-1} sono costituite da tre componenti: quella a 1310 cm^{-1} è attribuita alla componente amorfa, mentre a 1305 e 1285 cm^{-1} si trovano due componenti relative ai domini cristallini del PCL: una variazione del rapporto di intensità relativo delle due bande indica una variazione della cristallinità del polimero. Nessuno di questi marker spettroscopici ha subito variazioni significative dopo 28 giorni in alcun mezzo di degradazione. Le altre bande marker indicate in tabella 3 sono state utilizzate solo per un confronto qualitativo, poiché meno intense. Analoghe considerazioni possono essere fatte dopo 56 giorni di degradazione in PBS, SBF e NaOH, come si può osservare dall'andamento dei grafici in figura 13. Le analisi termiche avevano rivelato un leggero aumento della cristallinità del PCL, in particolare in NaOH: queste variazioni sono risultate notevolmente inferiori a quanto osservato per campioni di PCL puro sintetizzato con metodi analoghi e con simili caratteristiche chimico-fisiche [18-19] e sono difficilmente rivelabili con la tecnica spettroscopica adottata.

ASSEGNAZIONE	NUMERO D'ONDA	
$\nu\text{ C=O}$	1733 [36]	amorfo
	1720 [36]	cristallino
$\delta\text{ CH}_2$	1445 [36]	amorfo
	1470, 1439, 1415 [36]	cristallino
$\omega\text{ CH}_2$	1310 [36]	amorfo
	1305, 1285 [36]	cristallino
Vibrazione scheletro	1090, 1068 [36]	amorfo
	1110, 1063, 1033 [36]	cristallino
$\nu\text{ C-COO}$	868 [36]	amorfo
	912 [36]	cristallino

Tabella 3: bande marker della cristallinità osservate negli spettri micro-Raman della matrice di PCL.

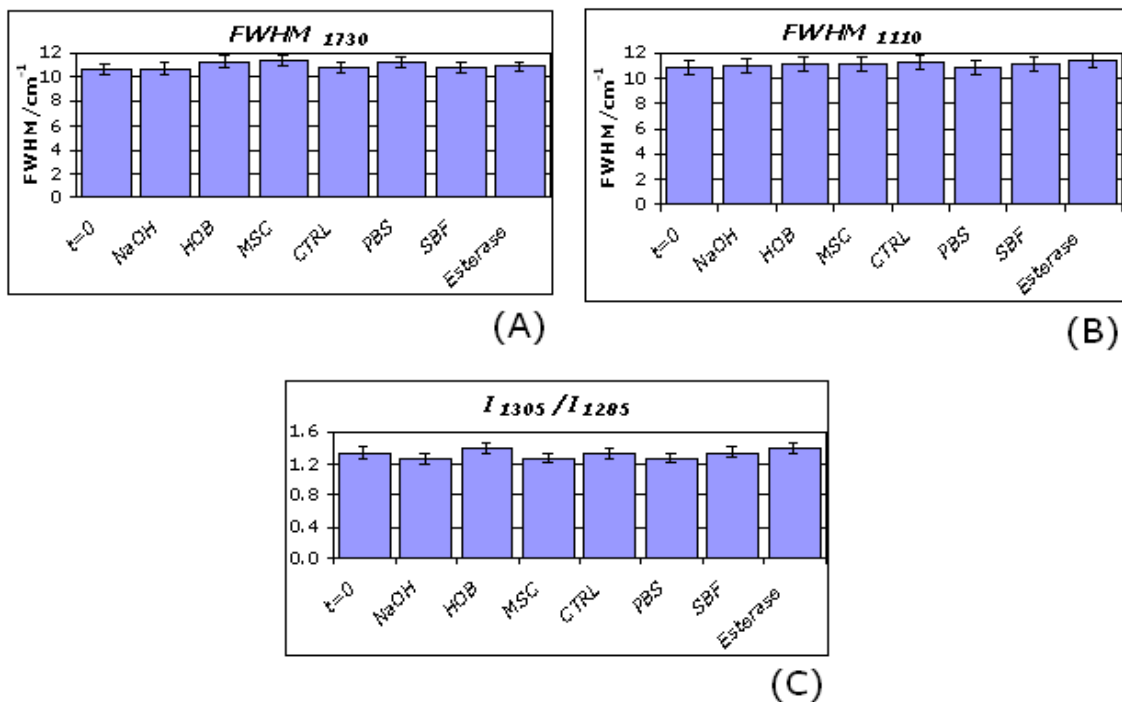


Figura 11: analisi di bande marker della variazione di cristallinità della matrice di PCL dopo 28 giorni. L'assegnazione delle bande è specificata nel testo.

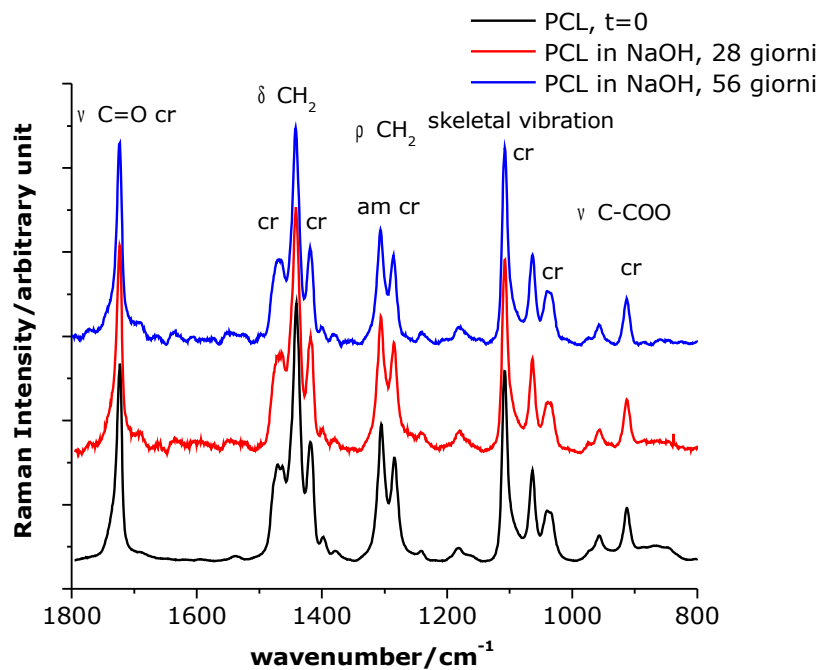


Figura 12: spettri della matrice di PCL prima e dopo degradazione per 28 e 56 giorni in NaOH. Si può osservare che le bande marker della cristallinità non variano in maniera significativa.

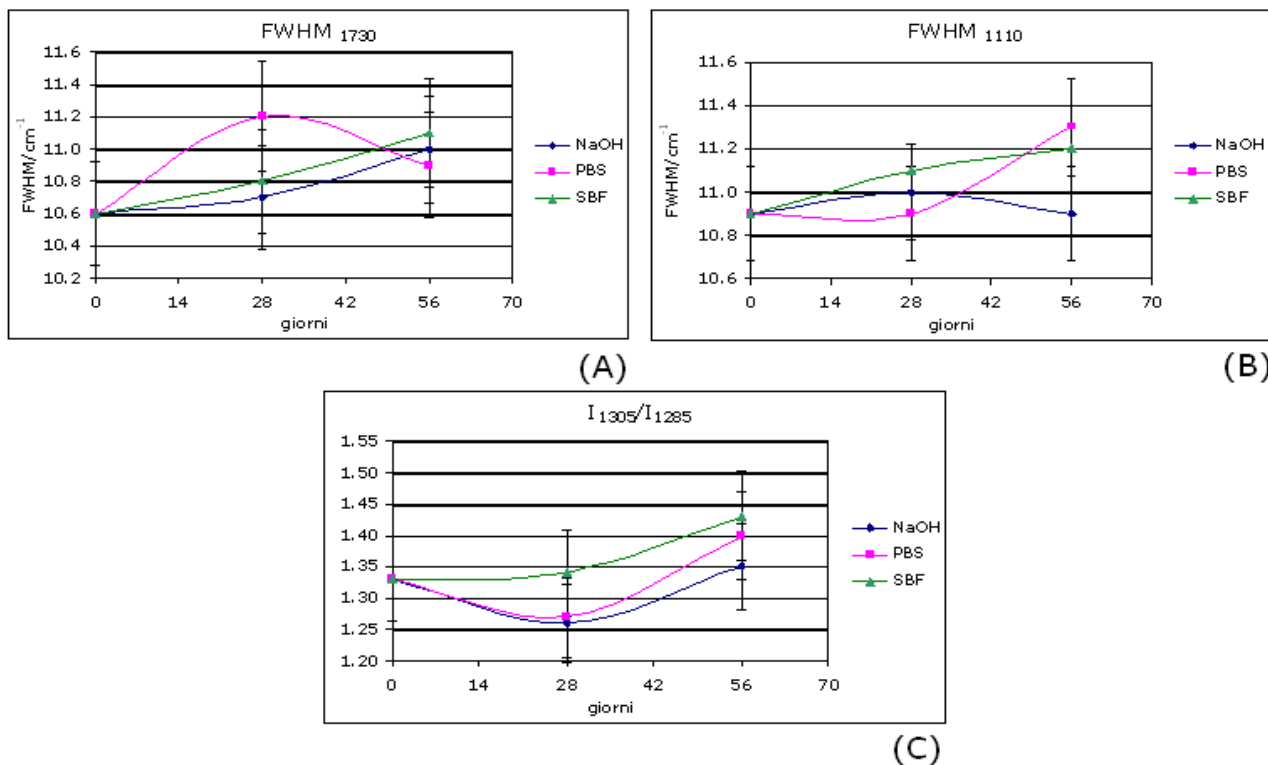


Figura 13: andamento dei marker della cristallinità del PCL in NaOH, PBS e SBF fino a 56 giorni di degradazione.

D - CONCLUSIONI

La spettroscopia micro-Raman accoppiata all'analisi termica si è dimostrata un metodo valido per caratterizzare i compositi di PCL/PLLA durante la degradazione in diverse soluzioni e in incubazione con cellule primarie. La degradazione in PBS e SBF non ha mostrato variazioni significative, mentre quella condotta in NaOH a pH 12 ha causato una perdita di peso di circa il 25% dopo 56 giorni. La degradazione ha riguardato in particolare le fibre di PLLA, più idrofiliche, infatti dopo 56 giorni si può affermare che il composito contiene una percentuale di PLLA inferiore al 5% contro un contenuto iniziale del 15%. Anche i campioni incubati con HOB e MSC hanno mostrato un certo grado di degradazione, in particolare le MSC si sono rivelate più aggressive rispetto alle HOB, sebbene per questi campioni sia stata possibile solo la caratterizzazione spettroscopica, poiché la presenza di residui di reagenti utilizzati durante i test di osteoconduttività non ha permesso di stimare con accuratezza le percentuali in peso delle due componenti polimeriche. La matrice polimerica di PCL non ha invece subito variazioni di cristallinità e di morfologia significative.

Bibliografia

- [1] Badylak S F. The extracellular matrix as a scaffold for tissue reconstruction. *Cell & developmental biology* 2002; 13: 377–383.
- [2] El-Baseir M M, Phipps M A, Kellaway I W. Preparation and subsequent degradation of poly(L-lactic acid) microspheres suitable for aerosolisation: a physico-chemical study. *International Journal of Pharmacology* 1997; 151: 145-153.
- [3] Chawla J S, Amiji M M. Biodegradable poly (ϵ -caprolactone) nanoparticles for tumor-targeted delivery of tamoxifen. *International Journal of Pharmacology* 2002; 249: 127-138.
- [4] Kweon H Y, Yoo M K, Park I K, Kim T H, Lee H C, Lee H-S, Oh J-S, Akaike T, Cho C-S. A novel degradable polycaprolactone networks for tissue engineering. *Biomaterials* 2003; 24: 801-808.
- [5] Brostrom J, Boss A, Chronakis I S. Biodegradable films of partly branched poly(L-lactide)-copoly(ϵ -caprolactone) copolymer: modulation of phase morphology, plasticization properties and thermal depolymerization. *Biomacromolecules* 2004; 5: 1124-1134.
- [6] De Groot J H, Zijlstra F M, Kuipers H W, Pennings A J, Klompmaker J, Veth R P H, Jansen H W B. Meniscal tissue regeneration in porous 50/50 copoly(L-lactide/ ϵ -caprolactone) implants. *Biomaterials* 1997; 18: 613-622.
- [7] Hamley I W, Castelletto V, Castillo R V, Muller J, Martin C M, Pollet E, Dubois P. Crystallization in poly(L-lactide)-b-poly(ϵ -caprolactone) double crystalline diblock copolymers: a study using X-ray scattering, differential scanning calorimetry and polarized optical microscopy. *Macromolecules* 2005; 38: 463-472.
- [8] Teng C, Yang K, Ji P, Yu M. Synthesis and characterization of poly(L-lactic acid)-poly(ϵ -caprolactone) multiblock copolymers by melt polycondensation. *Journal of Polymer Science* 2004; 42: 5045-5053.
- [9] Cooper J A, Lu H H, Ko F K, Freeman J W, Laurencin C T. Fiber-based tissue-engineered scaffold for ligament replacement: design considerations and *in vitro* evaluation. *Biomaterials* 2005; 26:1523-1532.
- [10] Causa F, Sarracino F, De Santis R, Netti P A, Ambrosio L, Nicolais L. Basic structural parameters for the design of composite structures as ligament augmentation devices. *Journal of Applied Biomaterials and Biomechanics* 2006; 4: 21-30.
- [11] Xong X, Bien H, Chung C Y, Yin L, Fang D, Hsiao B S, Chu B, Entcheva E. Electrospun fine-textured scaffolds for heart tissue constructs. *Biomaterials* 2005; 26: 5330-5338.
- [12] Cronin E M, Thurmond F A, Bassel-Duby R, Sanders Williams R, Wright W E, Nelson K D, Garner H R. Protein-coated poly(L-lactic acid) fibers provide a substrate for differentiation of human skeletal muscle cells. *Journal of Biomedical Materials Research* 2004; 69A: 3743-381.
- [13] Taddei P, Simoni R, Fini G. Spectroscopic study on the *in vitro* degradation of a biodegradable composite periodontal membrane. *Journal of Molecular Structure* 2001; 565-566: 317-322.
- [14] Taddei P, Tinti A, Fini G. Vibrational spectroscopy of polymeric biomaterials. *Journal of*

Raman Spectroscopy 2001; 32: 619-629 and references cited therein.

[15] Taddei P, Monti P, Simoni R. Vibrational and thermal study on the *in vitro* and *in vivo* degradation of a bioabsorbable periodontal membrane: Vicryl Periodontal Mesh (Polyglactin 910). *Journal of Material Science-Materials in Medicine* 2002; 13: 59-64.

[16] Taddei P, Monti P, Simoni R. Vibrational and thermal study on the *in vitro* and *in vivo* degradation of a poly(lactic acid)-based bioabsorbable periodontal membrane. *Journal of Material Science-Materials in Medicine* 2002; 13: 469-475.

[17] Reggiani M, Taddei P, Tinti A, Fagnano C. Spectroscopic study on the enzymatic degradation of a biodegradable composite periodontal membrane. *Biopolymers* 2004; 74: 146-150.

[18] Taddei P, Tinti A, Reggiani M, Fagnano C. *In vitro* mineralization of bioresorbable poly(ϵ -caprolactone)/apatite composites for bone tissue engineering: a vibrational and thermal investigation. *Journal of Molecular Structure* 2005; 744-747: 135-143.

[19] Taddei P, Di Foggia M, Causa F, Ambrosio L, Fagnano C. *In vitro* bioactivity of poly(ϵ -caprolactone)-apatite (PCL-AP) scaffolds for bone tissue engineering: the influence of the PCL/AP ratio. *International Journal of Artificial Organs* 2006; 29: 719-725.

[20] Kokubo T, Kushitani H, Sakka S, Kitsugi T, Yamamuro T. Solutions able to reproduce *in vivo* surface-structure changes in bioactive glass-ceramic A-W. *Journal of Biomedical Materials Research* 1990; 24: 721-734.

[21] Damen T C, Porto S P S, Bell T. Raman effect in zinc oxide. *Physical Review* 1965; 142: 570-574.

[21] Sivalingam G, Vijayalakshmi S P, Madras G. Enzymatic and thermal degradation of poly(ϵ -caprolactone), poly (D,L-lactide), and their blends. *Industrial Engineering and Chemical Research* 2004; 43: 7702-7709.

[22] Crescenzi V, Manzini G, Calzolari G, Borri C. Thermodynamics of fusion of poly- β -propiolactone and poly- ϵ -caprolactone. Comparative analysis of the melting of aliphatic polylactone and polyester chains. *European Polymer Journal* 1972; 8: 449-463.

[23] Leenslag JW, Gogolewski S, Pennings AJ. Resorbable materials of poly(L-lactide). V. Influence of secondary structure on the mechanical properties and hydrolyzability of poly(L-lactide) fibers produced by a dry spinning method. *Journal of Applied Polymer Science* 1984; 29: 2829-2842.

[24] Cam D, Hyon SH, Ikada Y. Degradation of high molecular weight poly(L-lactide) in alkaline medium. *Biomaterials* 1995; 16: 833-843.

[25] Tsuji H, Tezuka Y, Yamada K. Alkaline and enzymatic degradation of L-lactide copolymers. II. Crystallized films of poly(L-lactide-co-D-lactide) and poly(L-lactide) with similar crystallinities. *Journal of Polymer Science part B: Polymer Physics* 2005; 43: 1064-1075.

[26] Chen Y, Mak FT, Li J, Wang M, Shum AWT. Formation of apatite on poly(α -hydroxy acid) in an accelerated biomimetic process. *Journal of Biomedical Materials Research Part A: Applied Biomaterials* 2005; 73B: 68-76.

- [27] Vert M, Li S M, Spenlehauer G, Guerin P. Bioresorbability and biocompatibility of aliphatic polyesters. *Journal of Materials Science Materials in Medicine* 1992; 3: 432-446.
- [28] Fischer EW, Sterzel HJ, Wegner G. Investigation of the structure of solution grown crystals of lactide copolymers by means of chemical reactions. *Kolloid-Z Polymer* 1973; 251: 980-990.
- [29] Kang S, Hsu S L, Stidham H D, Smith P B, Leugers M A, Yang X. A spectroscopic analysis of poly(lactic acid) structure. *Macromolecules* 2001; 34: 4542-4548.
- [30] Smith P B, Leugers A, Kang S, Hsu S L, Yang X. An analysis of the correlation between structural anisotropy and dimensional stability for drawn poly(lactic acid) films. *Journal of Applied Polymer Science* 2001; 82: 2497-2505.
- [31] Kister G, Cassanas G, Vert M, Pauvert B, T  rol A. Vibrational analysis of poly(L-lactic acid). *Journal of Raman Spectroscopy* 1995 26: 307-311.
- [32] Hoogsteen W, Postema A R, Pennings A J, Brinke G, Zugenmaier P. Crystal structure, conformation and morphology of solution-spun poly(L-lactide) fibers. *Macromolecules* 1990; 23: 634-642.
- [33] De Santis P, Kovacs A J. Molecular conformation of poly(S-lactic acid). *Biopolymers* 1968; 6: 299-306.
- [34] Brizzolara D, Cantow H J, Diederichs K, Keller E, Domb A J. Mechanism of the stereocomplex formation between enantiomeric poly(lactide)s. *Macromolecules* 1996; 29: 191-197.
- [35] Kister G, Cassanas G, Bergouhon M, Hoarau D, Vert M. Structural characterization and hydrolytic degradation of solid copolymers of D,L-lactide-co-  -caprolactone by Raman spectroscopy. *Polymer* 2000; 41: 925-932.

PCL-HA

A - INTRODUZIONE

Lo scopo principale della Tissue Engineering ossea è quello di sostituire ed aiutare la guarigione di tessuti danneggiati o perduti a causa dell'età avanzata, di una malattia o di un trauma, utilizzando dei biomateriali di supporto dotati di un'opportuna struttura tridimensionale. [1] Questi scaffold fungono da substrato per l'attacco delle cellule che possono quindi proliferare e formare la matrice extracellulare. Nel caso ideale, gli scaffold dovrebbero essere bioassorbibili *in vivo* a velocità controllata, in modo tale che il volume occupato inizialmente dallo scaffold sia gradualmente sostituito dal tessuto ospite rigenerato.

Per rispondere alle diverse necessità delle possibili applicazioni cliniche, si può ricorrere a dei biomateriali multi componenti o con diversi livelli di organizzazione strutturale, che siano in grado di combinare le proprietà dei materiali utilizzati: porosità, proprietà meccaniche, velocità di biodegradazione e bioattività; lo studio dei materiali compositi ha come obiettivo quello di ottimizzare questi parametri partendo da materiali con caratteristiche anche molto diverse tra loro.

Il poli(ε-caprolattone) (PCL) possiede sufficienti proprietà meccaniche per essere utilizzato come scaffold [2-5] nelle applicazioni in cui è necessario un materiale con buona resistenza alla rottura (ad esempio come sostituto osseo), nelle quali le proprietà fisiche dello scaffold devono essere mantenute per almeno 6 mesi [8], poiché ha una cinetica di degradazione più lenta rispetto ad altri poliesteri alifatici a causa della sua maggiore idrofobicità [8]. Tuttavia alcuni studi hanno mostrato l'incapacità, da parte del solo PCL, di essere un valido sostituto osseo [8]. Per favorire il processo di rigenerazione ossea, alcuni autori suggeriscono l'uso di idrossiapatite (HA) [9-14], ovvero la componente principale della fase inorganica dell'osso. L'aggiunta di questa nuova fase costituisce un segnale osteoconduttivo oltre che un buon compromesso tra bioattività e aumento della resistenza del materiale. Molti autori hanno proposto l'utilizzo di materiali compositi a base di calcio fosfati per stimolare l'integrazione tra scaffold e tessuto osseo ospite [6, 7], tuttavia molti aspetti relativi alle variazioni strutturali *in vivo* e *in vitro* e all'influenza della inclusione di una fase ceramica sulla microstruttura del materiale non sono ancora del tutto chiariti.

La risposta dell'organismo ai biomateriali compositi dipende in buona parte dalla sterilizzazione alla quale essi sono stati sottoposti. Diversi tipi di procedure sono state applicate in questo ambito (ad esempio con gas di ossido di etilene o plasma a basse temperature, ecc..) [16, 17] e tra essi l'irraggiamento ad alte energie presenta numerosi vantaggi. Infatti, grazie alle eccellenti caratteristiche di penetrazione delle radiazioni ionizzanti, la sterilizzazione con radiazioni elimina i problemi collegati alla permanenza di residui di sterilizzante e di uniformità di penetrazione.

Le dosi per la sterilizzazione con radiazioni per dispositivi medici sono stabilite da procedure contenute nelle norme ISO 11137. La banca internazionale dei tessuti raccomanda 15 kGy per la decontaminazione e 25 kGy per la sterilizzazione batterica [18, 19]. Altri organismi internazionali

di controllo raccomandano una dose di 35 kGy [20].

Tuttavia, le radiazioni ad alta energia, oltre ad uccidere i batteri, possono causare variazioni nelle proprietà del materiale e modificare le interazioni fra le diverse fasi che lo compongono [22-26].

Questo studio ha come scopo quello di valutare le proprietà chimico-fisiche di materiali porosi compositi PCL/HA con rapporto tra componente polimerica e componente inorganica variabile, per valutare l'influenza del rapporto tra fase organica e fase inorganica sulla degradazione e sulla mineralizzazione del materiale *in vitro*. Per caratterizzare il meccanismo di degradazione *in vitro*, i diversi campioni di materiale composito e i campioni di PCL puro (come confronto) sono stati immersi in varie soluzioni acquose, tra cui una di Simulated Body Fluid (SBF, cioè con forza e concentrazioni ioniche simili a quella contenuta nei fluidi corporei) per valutare la capacità del composito di nucleare una componente apatitica. Inoltre si sono valutati anche i possibili effetti dovuti alle radiazioni sulle proprietà morfologiche e termiche dei compositi. A questo proposito i campioni sono stati irraggiati fino a 50 kGy, una dose superiore a quella raccomandata per la sterilizzazione [27], in atmosfera di azoto e in aria.

La caratterizzazione dei materiali è stata condotta utilizzando le spettroscopie Raman e IR accoppiate a tecniche di analisi termica come la termogravimetria (TG) e la calorimetria differenziale a scansione (DSC). [28-32] Le stesse tecniche sono state utilizzate per caratterizzare analoghi compositi incubati con cellule HOB (Human Osteoblasts) per valutare il ruolo di questo tipo di cellule nel processo di degradazione del materiale.

B – MATERIALI E METODI

I – Sintesi dei compositi

I compositi sono stati sintetizzati presso l'Istituto per la Tecnologia dei Materiali Compositi del CNR, in collaborazione con il Centro Interdisciplinare sui Biomateriali dell'Università di Napoli. Le tecniche di sintesi utilizzate per la produzione dei compositi sono l'inversione di fase e la salt-leaching, descritte precedentemente [6, 33]. Il PCL (Sigma-Aldrich, 65 kDa) è stato disciolto in una soluzione al 20% di N-N-dimetilacetamide (J T Baker) e agitato per 3 ore a 58°C. Dopo alcuni minuti è stato aggiunto NaCl con dimensioni di 200-300 µm in rapporto 9/1 ed è stata applicata una pressione di 0.13 N/mm² per omogeneizzare la distribuzione dell'agente porogeno. La miscela è stata lavata in etanolo e acqua distillata per rimuovere il sale e la soluzione. L'aggiunta delle particelle di HA è stata effettuata prima dell'estrazione del solvente, dopo la completa dissoluzione del PCL. I differenti compositi sono stati realizzati aggiungendo una quantità di HA variabile tra il 40 e il 100% in peso rispetto al polimero (30-50% rispetto al composito), corrispondente ad un volume di HA compreso tra il 13 e il 36%. Tutti i campioni analizzati appartengono allo stesso lotto di produzione, eccetto i campioni di PCL/HA 30/70 utilizzati nei test di coltura cellulare.

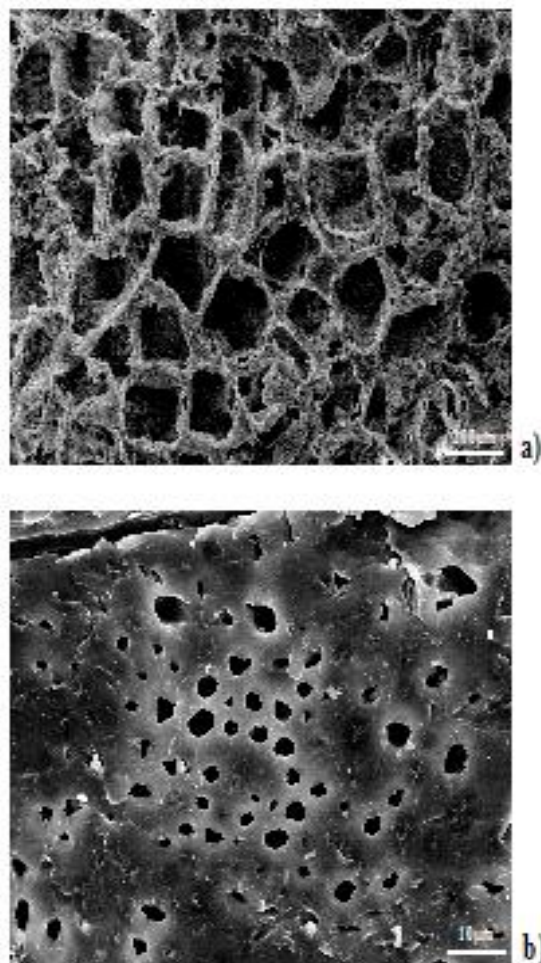


Figura 1: immagini SEM a diversi ingrandimenti del composito PCL/HA 70/30, che mettono in evidenza la macroporosità (a) e la microporosità (b) del materiale.

II – Degradazione e variazioni di peso dei campioni

La degradazione *in vitro* è stata condotta in condizioni sterili in quattro differenti soluzioni acquose, a 37 °C: tampone fosfato (PBS) a pH 7.5, soluzione 0.01 M di NaOH (pH = 12), soluzione SBF (Simulated Body Fluid) tamponata a pH 7.5 (Na^+ 142 mM, K^+ 4 mM, Ca^{2+} 2.5 mM, Cl^- 148.8 mM, HCO_3^- 4.2 mM, HPO_4^{2-} 1 mM [34]) e soluzione enzimatica di esterasi in PBS (confronta capitolo sui compositi PCL/PLLA). I campioni di composito e di PCL puro sono stati immersi in etanolo per 24 ore prima dell'immersione nel mezzo di degradazione. Le soluzioni di NaOH, PBS e SBF sono state sterilizzate ponendole in autoclave per 20 minuti prima del loro uso e sono state rinnovate ogni sette giorni per mantenere costanti le proprietà chimiche dei mezzi di degradazione. La soluzione enzimatica è stata rinnovata ogni giorno in modo da mantenere l'attività enzimatica costante durante tutto il periodo di degradazione. Ogni sette giorni i campioni sono stati essiccati sotto vuoto a temperatura ambiente fino a raggiungere un peso costante, dopodiché sono stati pesati per seguire le variazioni di peso dovute all'immersione nelle diverse soluzioni.

I cambiamenti di peso dei compositi immersi in SBF sono espressi come guadagno in peso percentuale secondo l'equazione:

$$\% \text{ guadagno peso} = 100 (w_t - w_0)/w_0 \quad (1)$$

w_t è il peso del campione dopo un determinato tempo t di degradazione,

w_0 è il peso iniziale.

La perdita di peso percentuale per i compositi immersi negli altri mezzi di degradazione è stata calcolata con la seguente equazione:

$$\% \text{ perdita peso} = 100 (w_0 - w_t)/w_0 \quad (2)$$

III – Analisi spettroscopiche

Gli spettri Raman sono stati registrati con uno spettrometro Jasco R1100, equipaggiato con laser a ioni di argon (Innova Coherent 70), utilizzando come linea eccitatrice la linea blu a 488 nm, potenza sul campione di circa 40 mW e risoluzione di 4 cm^{-1} . A causa della fluorescenza dei campioni in coltura cellulari, i loro spettri Raman sono stati registrati su uno spettrometro Bruker IFS66 equipaggiato con il modulo FT-Raman FRA-106 e detector al Germanio raffreddato ad azoto liquido (per un confronto tra spettroscopia Raman tradizionale e FT-Raman si consulti il capitolo sulla strumentazione). La risoluzione spettrale è stata di 4 cm^{-1} . Il laser di eccitazione è un Nd^{3+} -YAG (1064 nm) in configurazione backscattering (180°) e potenza sul campione di circa 180mW. Il contenuto di HA è stato stimato dalle bande di fluorescenza tipiche delle carbonato apatiti sintetiche (a circa 770 cm^{-1}) [21] presenti nello spettro FT-Raman e le intensità delle bande sono espresse come altezze.

Gli spettri IR sono stati registrati su uno strumento Nicolet 5700 FTIR, con accessorio ATR a cristallo di diamante e detector DTGS.

IV – Analisi termiche

Le misure di termogravimetria sono state effettuate su una termobilancia Mettler TA-STAR, TGA/SDTA 851 $^\circ$, con velocità di riscaldamento di 2 $^\circ\text{C}$ al minuto, da 25 a 1000 $^\circ\text{C}$; la perdita di peso relativa alla decomposizione della parte polimerica è stata valutata tra 200 e 500 $^\circ\text{C}$ (tra 25 e 200 $^\circ\text{C}$ la perdita di peso del campione è imputabile al contenuto residuo di acqua). Le misure DSC sono state effettuate su un calorimetro Mettler TA-STAR, DSC 821 $^\circ$ su un intervallo compreso tra 5 e 120 $^\circ\text{C}$. Nel primo run è stata utilizzata una velocità di riscaldamento di 2 $^\circ\text{C}$ al minuto, seguita da un raffreddamento alla medesima velocità nello stesso intervallo di temperature. Una tipica scansione DSC presenta la fusione dei domini cristallini della componente polimerica: l'area sottesa da questo picco è l'entalpia di fusione del polimero, da cui è possibile calcolare il grado di cristallinità $X_c\%$.

$$X_c\% = 100 (\Delta H_{m1}/\Delta H_m^\circ) \quad (3)$$

ΔH_{m1} è l'entalpia di fusione misurata nel primo run,

ΔH_m° è l'entalpia di fusione del PCL completamente cristallino ($\Delta H_m^\circ = 139 \text{ J/g}$) [36].

La capacità di cristallizzazione del polimero dopo la fusione è stata valutata attraverso la frazione cristallizzabile (CF%):

$$CF\% = 100 (\Delta H_c/\Delta H_{m1}) \quad (4)$$

ΔH_c è l'entalpia di cristallizzazione misurata nel secondo run e corrisponde all'area sottesa dalla curva di cristallizzazione.

I polimeri semicristallini ad elevato peso molecolare possono cristallizzare in diversi domini cristallini, facendo aumentare il numero di vincoli legati al processo di cristallizzazione: l'aumento dei legami tra i diversi cristalliti fa aumentare il numero di regioni che non riescono a cristallizzare, determinando un aumento del contenuto di domini amorfi. In maniera analoga la frazione cristallizzabile aumenta se le catene polimeriche vengono accorciate in modo tale che esse riescono a cristallizzare più facilmente durante il raffreddamento del polimero fuso.

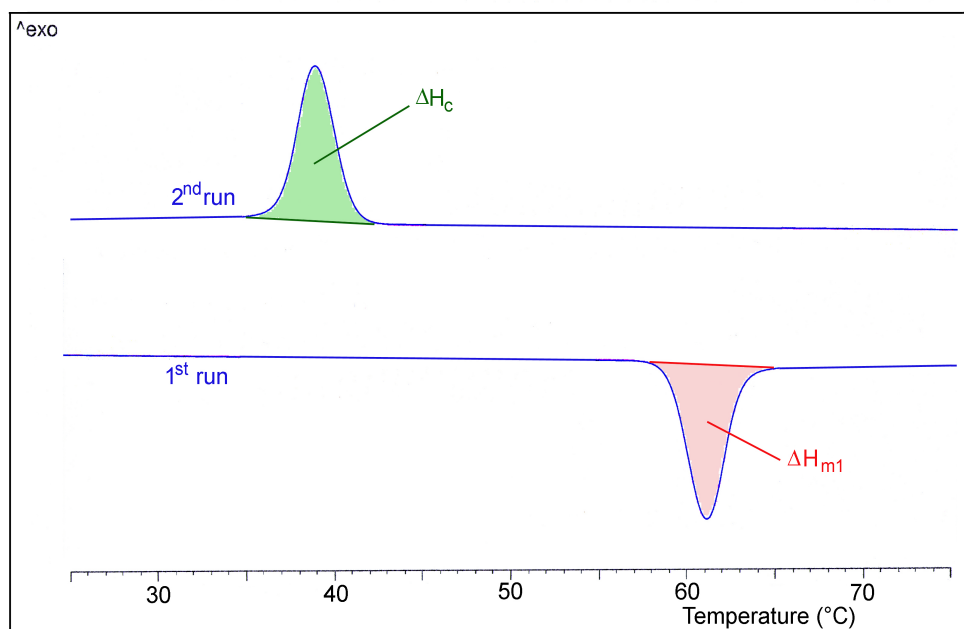


Figura 2: tipico tracciato DSC con evidenziate le aree corrispondenti al picco di fusione (nel primo run, con il massimo nell'intervallo 61-63°C) e al picco di cristallizzazione (nel secondo run, con massimo nell'intervallo 37-41°C).

V - Irraggiamento

I campioni sono stati irraggiati con raggi gamma da una gammacell ^{60}Co Nordion 220 presso l'Istituto per la Sintesi Organica e la Fotoreattività (ISOF) del CNR di Bologna.

La calibrazione della gammacell è stata effettuata usando un dosimetro di Fricke. I campioni sono stati irraggiati alla velocità di 0.65 kGy/h con incertezza di $\pm 2\%$. I campioni sono stati collocati in un contenitore di polimetilmetacrilato (con pareti di 5 mm, adatte per l'equilibrio elettronico e 5 cm di diametro interno) e irraggiati fino a 50 kGy (dose in acqua).

Per investigare l'influenza dell'atmosfera in cui viene condotto l'irraggiamento i campioni sono stati irraggiati in provette ermetiche in atmosfera di azoto o aria.

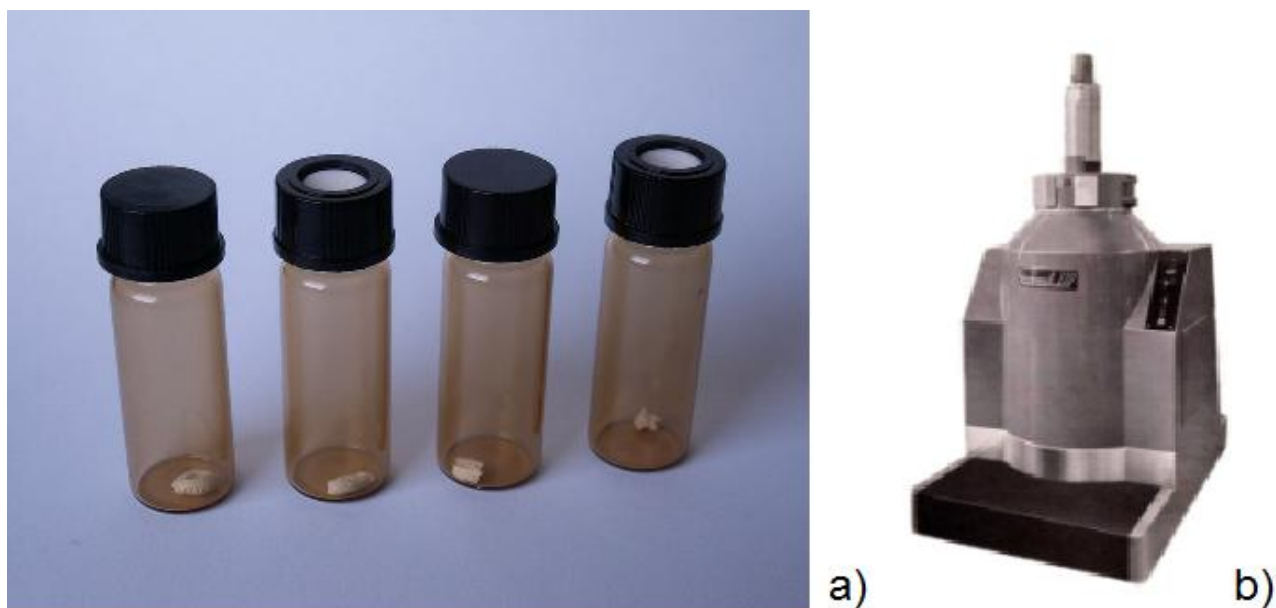


Figura 3: a): portacampioni utilizzati per la sterilizzazione con raggi- γ ; b) gammacell

C – RISULTATI E DISCUSSIONE

I - PCL e PCL/HA non degradati

In tabella 1 si riportano i dati TG e DSC ottenuti dai termogrammi di tutti i campioni non degradati. I dati termogravimetrici indicano che la percentuale di componente apatitica varia tra il 24 e il 50% in peso (w/w). L'analisi DSC ha invece dimostrato che il metodo di sintesi utilizzato per la preparazione dei compositi ha modificato il polimero, infatti si osserva un aumento del grado di cristallinità dal 71 al 74-84%; la frazione cristallizzabile è rimasta pressoché invariata. Il campione di PCL/HA 70/30 utilizzato per i test di coltura cellulari e proveniente da un diverso lotto, ha cristallinità simile al PCL puro, ma frazione cristallizzabile notevolmente superiore.

CAMPIONE	CRISTALLINITA' (X _c %)	FRAZIONE CRISTALLIZZABILE (CF%)	% PCL (w/w)
PCL	71	65	100
PCL/HA 70/30	74	62	74
PCL/HA 70/30 test cellulare	69	88	76
PCL/HA 60/40	76	65	60
PCL/HA 50/50	84	62	50

Tabella 1: proprietà dei campioni non degradati. La composizione percentuale è stata ricavata dalla termogravimetria, questo dato, inserito nelle equazioni (3) e (4) ha permesso di ricavare il grado di cristallinità e la frazione cristallizzabile dalle misure DSC.

L'analisi Raman (figura 4) ha confermato che il campione PCL/HA 50/50 contiene la componente polimerica con più alta cristallinità: infatti in questo composito le componenti a 1735 cm^{-1} ($\nu\text{ C=O}$) e 1090 cm^{-1} (vibrazione dello scheletro), tipiche del PCL amorfo [37], hanno intensità relativa minore: ciò si traduce in una diminuzione della semilarghezza delle bande legate al PCL cristallino a 1725 cm^{-1} ($\nu\text{ C=O}$) e 1107 cm^{-1} (vibrazione dello scheletro), proprie dei domini cristallini [37]. Si può notare anche una diminuzione del rapporto di intensità relativa tra le bande a 1305 cm^{-1} (PCL amorfo e cristallino [37]) e a 1285 cm^{-1} (PCL cristallino [37]), attribuite a $\omega\text{ CH}_2$.

Risultati analoghi ha fornito l'analisi IR (figura 5): lo spettro del composito PCL/HA 50/50 mostra le bande tipiche del PCL cristallino a 1721 cm^{-1} ($\nu\text{ C=O}$) e a 1165 cm^{-1} ($\nu\text{ C-O-C}$) più strette rispetto agli altri campioni; il restringimento delle bande indica una diminuzione del disordine dinamico dei gruppi. Un analogo aumento della cristallinità con il contenuto di HA è stato osservato in precedenza da altri autori [38] e attribuito alla riduzione dei domini cristallini di PCL dovuto alla presenza della fase inorganica, che conduce alla formazione di cristalliti più piccoli.

L'analisi spettroscopica ha anche confermato la composizione relativa dei compositi. Infatti, le bande Raman attribuibili all'idrossiapatite a $1065\text{-}1042$ e 963 cm^{-1} ($\nu\text{ PO}_4$) [39], $609\text{-}592\text{-}581$ e $487\text{-}446\text{-}431\text{ cm}^{-1}$ ($\delta\text{ PO}_4$) [39] sono aumentate di intensità rispetto alle bande del PCL secondo l'ordine $\text{PCL/HA } 50/50 > \text{PCL/HA } 60/40 > \text{PCL/HA } 70/30$, in completo accordo con i dati termogravimetrici. In maniera analoga, le bande IR tipiche dei calcio-fosfati a 3570 , $1092\text{-}1036$, 962 , 631 e $603\text{-}565\text{ cm}^{-1}$ [39] sono aumentate di intensità rispetto a quelle del polimero con lo stesso andamento. Lo spettro IR della componente apatitica mostra anche la presenza di bande a $1458\text{-}1415$ e 875 cm^{-1} [39], attribuibili rispettivamente allo stiramento e al piegamento degli ioni carbonato, che permettono di affermare che la fase inorganica è formata da una carbonato idrossiapatite di tipo B (in cui lo ione carbonato sostituisce lo ione fosfato nel reticolo cristallino) con un contenuto di carbonato di circa il 3% w/w, calcolato con il metodo di Featherstone [40].

Questo metodo consiste nel calcolo del rapporto di estinzione tra la banda del carbonato nello spettro IR a circa 1420 cm^{-1} e quella del fosfato a circa 565 cm^{-1} . Il coefficiente di estinzione si calcola nel modo seguente:

$$E = \log (T_2/T_1) \quad (5)$$

T_2 : trasmittanza misurata in corrispondenza della linea di base;

T_1 : trasmittanza misurata in corrispondenza del picco.

Questo rapporto (E_{1420}/E_{565}) è direttamente legato al contenuto di carbonato nelle idrossiapatiti. E_{1420}/E_{565} è stato determinato dagli spettri IR dei campioni e il contenuto di carbonato è stato calcolato per interpolazione della retta di calibrazione ottenuta riportando E_{1420}/E_{565} in funzione del contenuto di carbonato di una serie di miscele (0, 2, 5, 10 e 15% w/w) di BaCO_3 e idrossiapatite (Aldrich-Chemie GmbH & Co, Steinheim, Germany).

L'equazione sperimentale ($R = 0.998$) ricavata per le miscele utilizzata per calcolare il contenuto di carbonato nell'idrossiapatite contenuta nei compositi è stata la seguente:

$$\% \text{ wt/wt carbonato} = 17.1 [E_{1420}/E_{565}] \quad (6)$$

in cui il valore 17.1 è stato calcolato a partire dal valore della pendenza della retta di calibrazione delle miscele BaCO_3 /idrossiapatite (9.6784), moltiplicato per il fattore di conversione 1.75 che tiene conto delle differenze tra i due sistemi analizzati.

Il metodo consente una stima del contenuto di carbonato con errore di $\pm 10\%$ nell'intervallo di concentrazione 1-12% wt/wt.

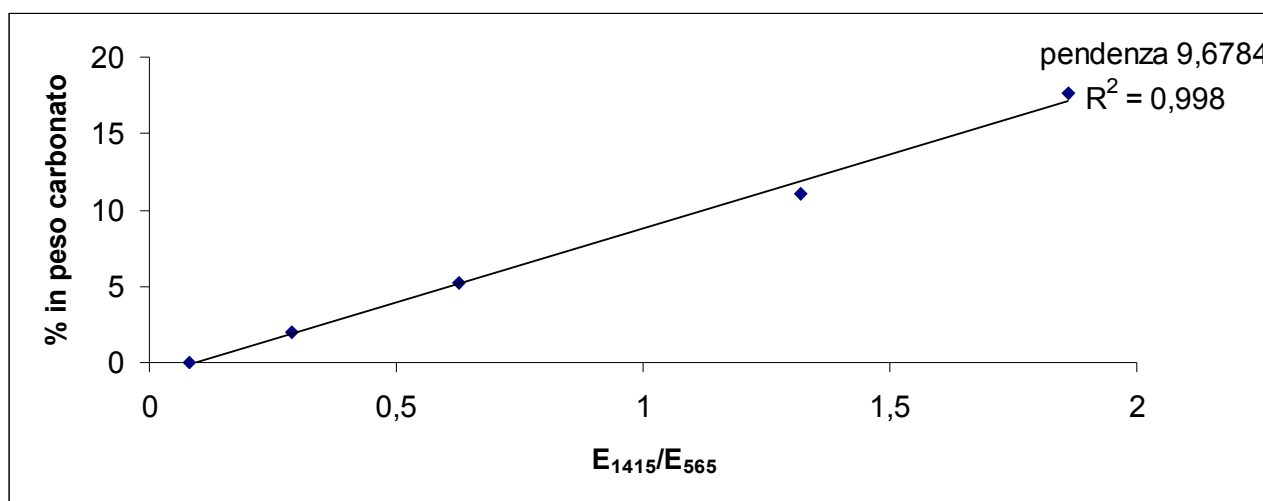


Figura 4: retta di calibrazione sperimentale per la stima del contenuto di carbonato con il metodo di Featherstone [40]

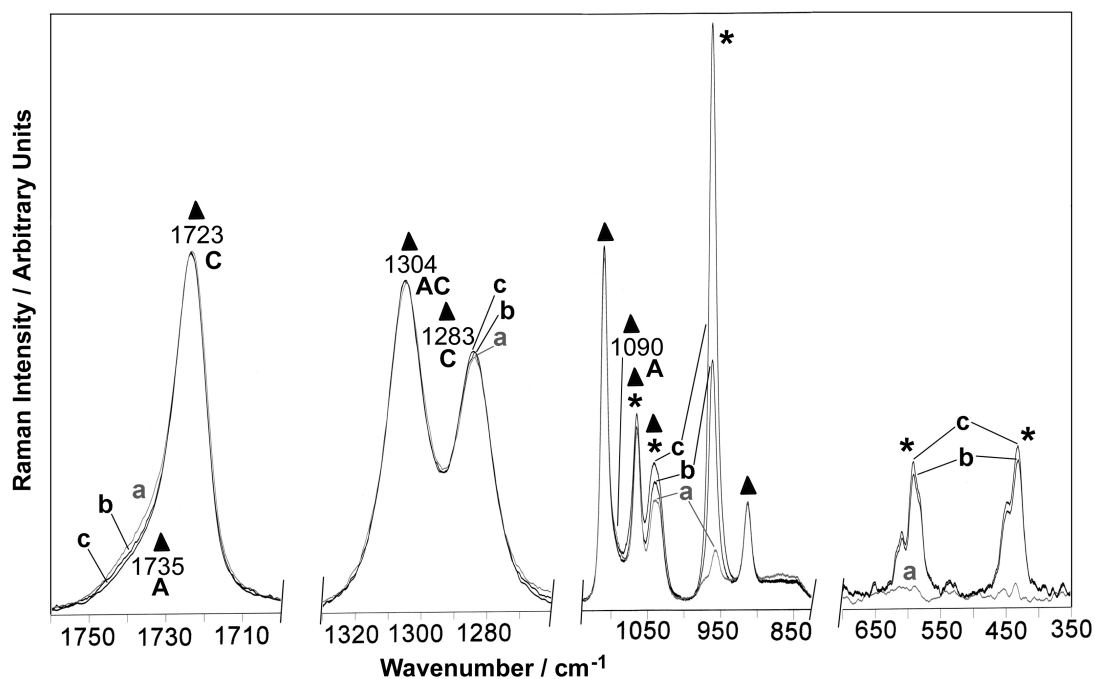


Figura 5: spettri Raman dei campioni non degradati. a: PCL puro; b: PCL/HA 70/30; c: PCL/HA 50/50. *: bande relative a HA; ▲: bande relative a PCL (A: amorfo; C: cristallino).

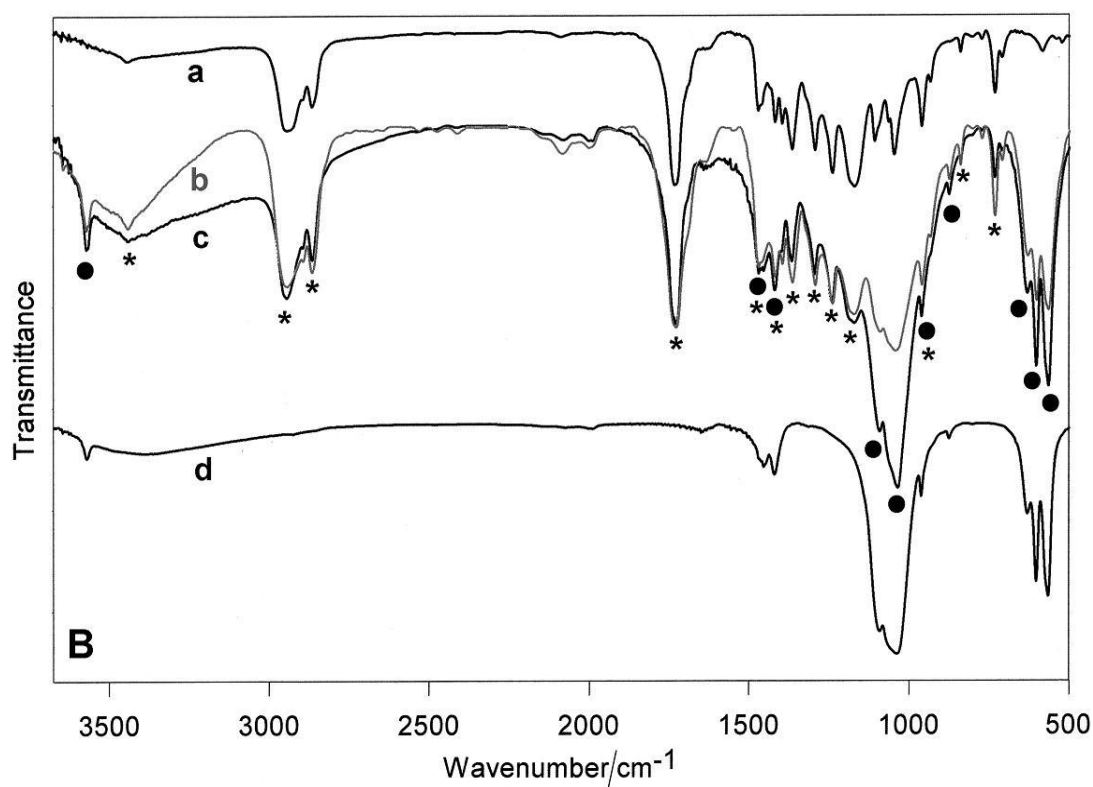


Figura 6: spettri FT-IR dei campioni non degradati. a: PCL puro; b: PCL/HA 70/30; c: PCL/HA 50/50; d: HA estratta sciogliendo il materiale in CH_2Cl_2 . *: bande relative a PCL; ●: bande relative a HA.

II – Degradazione del PCL puro

La figura 6 riporta l'andamento della perdita di peso percentuale dei campioni di PCL puro in funzione del tempo di degradazione nelle differenti soluzioni. Come si può notare, la velocità di degradazione più elevata si osserva in soluzione alcalina. Infatti, l'effetto catalitico degli ioni OH^- sulla degradazione dei poliesteri è stata descritta in numerosi lavori precedenti [28-31, 41], mentre il ruolo dell'attività enzimatica nella degradazione di dispositivi contenenti PCL è ancora dibattuto [31, 42]. La figura suggerisce che l'effetto catalitico dell'esterasi è meno pronunciato rispetto a quello dello ione OH^- : un risultato opposto era stato trovato nel caso di membrane periodontali a base di PCL [26]. Anche i campioni immersi in SBF mostrano un andamento analogo a quelli immersi in NaOH nelle prime settimane di degradazione. Questo risultato può essere spiegato in accordo con alcuni autori che hanno sottolineato il ruolo della forza ionica della soluzione sulla velocità di degradazione dei poliesteri alifatici. [43] Piccole variazioni di peso sono state osservate invece in PBS, per il quale sono state descritte cinetiche di tipo sigmoidale [29-30] in cui una fase con lenta perdita di peso è seguita da un notevole incremento della degradazione: evidentemente i campioni analizzati sono ancora nella prima fase di degradazione lenta.

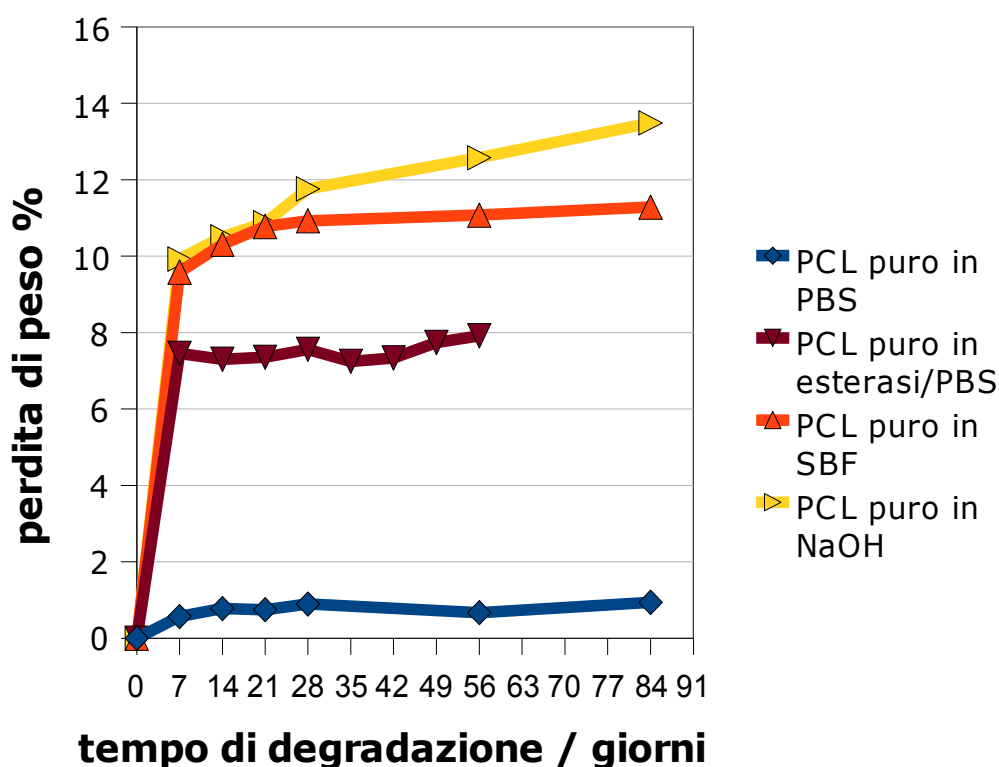


Figura 7: perdita di peso dei campioni di PCL puro nei diversi mezzi di degradazione.

Come si può osservare dai dati di tabella 2, le misure DSC mostrano che la degradazione dei campioni di PCL puro ha causato un aumento di cristallinità indipendente dal mezzo di

degradazione. I campioni degradati in soluzione alcalina mostrano gli aumenti di cristallinità più elevati rispetto al PCL non degradato: negli spettri Raman (figura 7), le componenti tipiche del PCL amorfo a 1735, 1090 e 870 cm^{-1} diminuiscono di intensità dopo la degradazione, mentre le bande dovute al PCL cristallino a 1110, 1042 e 912 cm^{-1} [37], aumentano di intensità. La banda a 1470 cm^{-1} appare più risolta, come nel PCL cristallino [37] e il rapporto di intensità tra le bande a 1305 e 1285 cm^{-1} è diminuito: gli spettri Raman confermano quindi l'aumento del grado di cristallinità precedentemente osservato con la calorimetria. Questo comportamento può essere spiegato considerando che nei polimeri semi-cristallini la degradazione inizia nelle componenti amorfe [44]; se queste parti abbandonano il materiale, il grado di cristallinità aumenta. Dopo la degradazione per 56 giorni, la frazione cristallizzabile è aumentata in tutti i mezzi di degradazione. La frazione cristallizzabile è in relazione con la lunghezza delle catene polimeriche. Se la lunghezza della catena carboniosa si è ridotta, le catene così accorciate sono in grado di cristallizzare meglio e quindi nel secondo run il CF% aumenta. L'aumento più elevato di CF% si è osservato nei campioni degradati nella soluzione alcalina e in quella enzimatica, indicando che in questi ambienti di degradazione la lunghezza media delle catene polimeriche ha subito la diminuzione più rilevante. Anche il campione immerso in PBS mostra degli incrementi di Xc% e di CF%, nonostante la bassa perdita di peso riportata: il dato evidenzia un certo livello di riorganizzazione delle catene polimeriche.

MEZZO E TEMPO DI DEGRADAZIONE	CRISTALLINITA' (Xc%)	FRAZIONE CRISTALLIZZABILE (CF%)
PCL non degradato	71	65
PBS, 28 giorni	78	65
PBS, 56 giorni	76	70
SBF, 28 giorni	78	69
SBF, 56 giorni	78	68
Esterasi, 28 giorni	74	76
Esterasi, 56 giorni	75	68
NaOH, 28 giorni	81	71
NaOH, 56 giorni	83	81

Tabella 2: variazioni del grado di cristallinità e della frazione cristallizzabile dei campioni di PCL puro. I dati sono stati ottenuti tramite analisi termica DSC e TG.

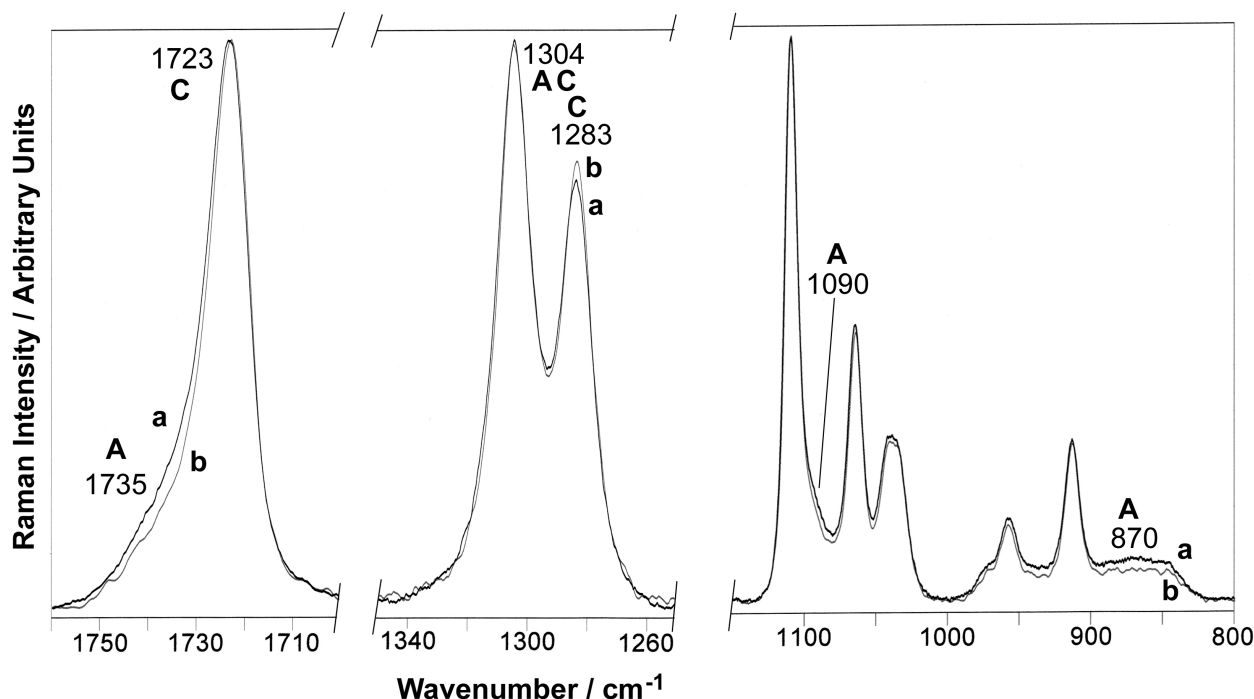


Figura 8: spettri Raman dei campioni di PCL puro prima (a) e dopo degradazione di 56 giorni (b) in NaOH. A: bande relative al PCL amorfo; C: bande relative al PCL cristallino.

III – Degradazione dei campioni composti PCL/HA

La figura 8 riporta l'andamento della perdita di peso percentuale in funzione del tempo di degradazione nella soluzione di NaOH. I campioni degradati in PBS e in esterasi non mostrano perdite di peso significative e gli andamenti non sono quindi riportati. E' interessante notare come i campioni di materiale composito mostrino una perdita di peso significativamente più bassa rispetto ai campioni di PCL puro in NaOH. In figura 8 e in tabella 3, i dati di perdita di peso sono riferiti a tutto il composito. Dai dati di composizione relativa ottenuti dalla termogravimetria è però possibile separare la perdita di peso relativa al PCL e quella relativa ad HA; così facendo le perdite di peso relative al solo polimero sono notevolmente più basse: in PCL/HA 50/50 dopo 56 giorni la perdita di peso è quasi nulla (la perdita di peso totale è di poco superiore al 5% e la termogravimetria ha evidenziato che il contenuto di apatite è diminuito anch'esso del 5%), in PCL/HA 60/40 la perdita di peso è di circa il 3%, mentre in PCL/HA 70/30 è di circa 1%. Questo comportamento può essere dovuto a due diversi fenomeni. La cristallinità influenza la velocità di degradazione dei poliesteri alifatici: difatti polimeri molto cristallini degradano molto più lentamente rispetto agli amorfi [45]. Quindi, alla luce dei dati in figura, il comportamento dei composti è facilmente comprensibile ricordando che essi mostravano tutti una cristallinità superiore al PCL puro. Tuttavia, il comportamento del campione PCL/HA 70/30 suggerisce che la cristallinità non può essere l'unico parametro ad influenzare la degradazione. Infatti sebbene quest'ultimo campione sia caratterizzato da un grado di cristallinità iniziale molto simile a quella del PCL puro, la sua perdita di peso è

significativamente più bassa. In accordo con altri autori, queste considerazioni portano a ipotizzare che la componente apatitica possa svolgere un ruolo significativo nel prevenire la degradazione [46], costituendo sia un ostacolo fisico per la penetrazione delle soluzioni all'interno dei pori dei materiali, sia svolgendo una moderata azione tamponante. Questo effetto protettivo non riesce a spiegare completamente il comportamento dei compositi. Infatti, il campione caratterizzato dalla più alta concentrazione di idrossiapatite (PCL/HA 50/50) mostra anche la perdita di peso più significativa dopo 84 giorni in NaOH. Un esame attento dei dati di termogravimetria (tabella 3, quarta colonna), rivela che il campione ha aumentato il suo contenuto in PCL, indicando che anche la componente inorganica è coinvolta nella degradazione, come già osservato da altri autori [26-30]: la perdita di peso di questo campione può essere dunque imputata alla rimozione di idrossiapatite.

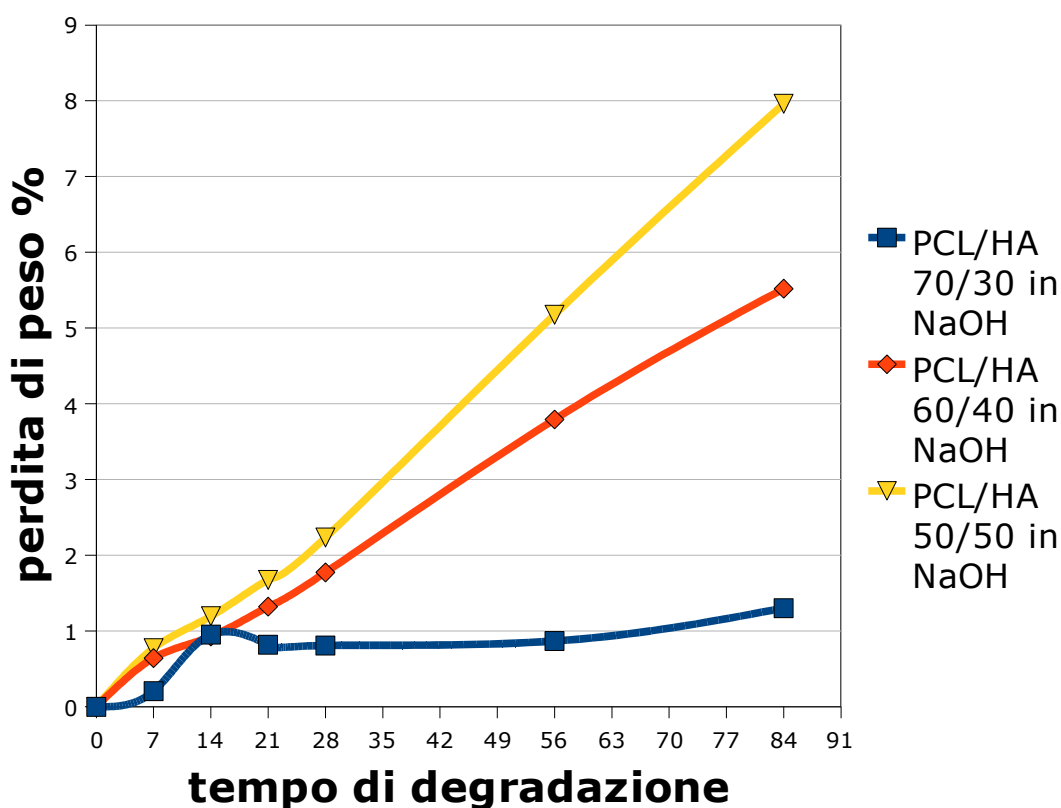


Figura 9: perdite di peso misurate nei diversi compositi in NaOH.

Per quanto riguarda i campioni immersi in PBS, si osservano significative variazioni di cristallinità e frazione cristallizzabile, come precedentemente rilevato per i campioni di PCL puro. Nei compositi si osserva però un calo della cristallinità, dovuto essenzialmente alla diversa cristallinità iniziale dei campioni e un aumento (anche notevole) della frazione cristallizzabile, per la quale sono valide le considerazioni precedentemente espresse per il PCL puro.

Le variazioni osservate in soluzione enzimatica seguono lo stesso andamento dovuto alla

riorganizzazione strutturale delle catene polimeriche: la degradazione ha causato una perdita in peso di PCL del 4-5% in tutti i compositi dopo 56 giorni, come si può osservare dai dati in tabella 3.

MEZZO E TEMPO DI DEGRADAZIONE	CRISTALLINITA' (X _c %)	FRAZIONE CRISTALLIZZABILE (CF%)	% PCL (w/w)
PCL/HA 70/30 non degradato	74	62	74
PCL/HA 70/30 in PBS, 28 giorni	68	85	75
PCL/HA 70/30 in PBS, 56 giorni	59	93	77
PCL/HA 70/30 in Esterasi, 28 giorni	59	90	81
PCL/HA 70/30 in Esterasi, 56 giorni	64	74	79
PCL/HA 70/30 in NaOH, 28 giorni	62	83	75
PCL/HA 70/30 in NaOH, 56 giorni	79	70	76
PCL/HA 60/40 non degradato	76	65	60
PCL/HA 60/40 in PBS, 28 giorni	69	79	61
PCL/HA 60/40 in PBS, 56 giorni	71	74	63
PCL/HA 60/40 in Esterasi, 28 giorni	75	68	61
PCL/HA 60/40 in Esterasi, 56 giorni	72	67	64
PCL/HA 60/40 in NaOH, 28 giorni	67	88	63
PCL/HA 60/40 in NaOH, 56 giorni	83	67	60
PCL/HA 50/50 non degradato	84	62	50
PCL/HA 50/50 in PBS, 28 giorni	74	81	51
PCL/HA 50/50 in PBS, 56 giorni	54	86	52
PCL/HA 50/50 in Esterasi, 28 giorni	74	81	50
PCL/HA 50/50 in Esterasi, 56 giorni	68	71	54
PCL/HA 50/50 in NaOH, 28 giorni	74	74	51
PCL/HA 50/50 in NaOH, 56 giorni	72	68	55

Tabella 3: variazioni delle caratteristiche morfologiche della componente polimerica dei materiali compositi nei diversi mezzi di degradazione.

Lo studio della degradazione in ambiente alcalino ha mostrato caratteristiche molto interessanti: infatti PCL/HA 70/30 e PCL/HA 60/40 mostrano una diminuzione di cristallinità dopo 28 giorni, seguita da un aumento a 56 giorni (figura 9 A): evidentemente le catene polimeriche si sono accorciate a tal punto da avere una mobilità sufficiente per riorganizzarsi in uno stato più ordinato e quindi maggiormente cristallino. Il PCL/HA 50/50 mostra invece una diminuzione di cristallinità continua, mentre il CF% (figura 9 B) è simile a quello degli altri campioni, sebbene sia quello che mostra le variazioni inferiori rispetto al campione iniziale (indicando una minore frammentazione delle catene). Questo risultato è supportato dai dati TG (figura 10), che mostrano un andamento bimodale della decomposizione del PCL, con un picco a temperature inferiori dovuto alle catene polimeriche più degradate. Questo andamento non è stato osservato né nei campioni di partenza, né in PCL/HA 50/50.

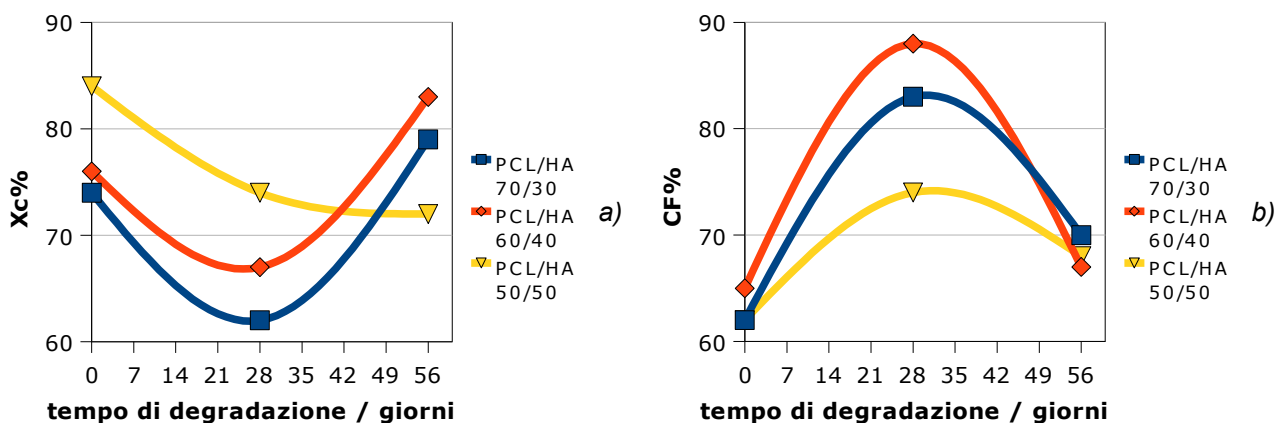


Figura 10: andamento della cristallinità (a) e della frazione cristallizzabile (b) dei compositi in NaOH.

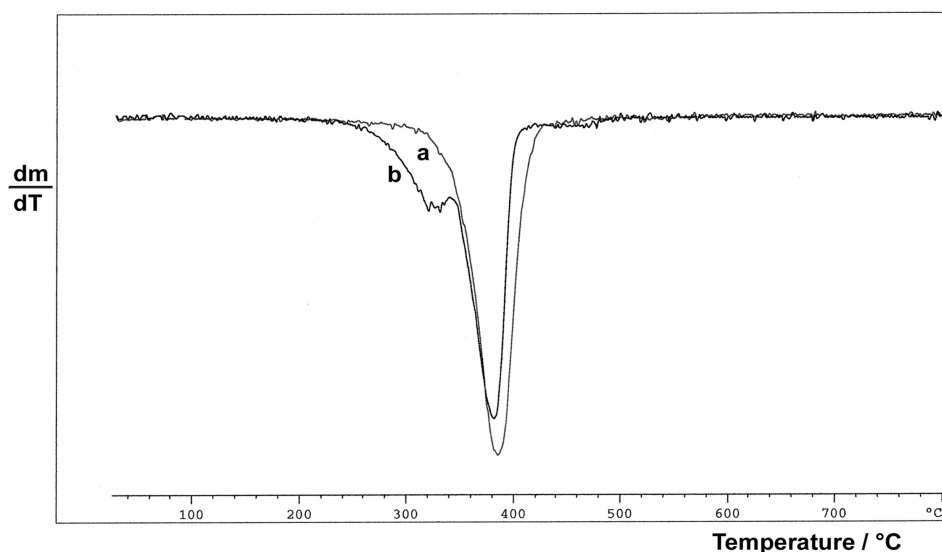


Figura 11: Termogravimetria differenziale del composito PCL/HA 50/50 (a) e PCL/HA 70/30 (b).

IV – Mineralizzazione dei campioni compositi PCL/HA

La figura 11 riporta l'andamento dell'aumento di peso percentuale in funzione del tempo in SBF. Dopo 56 giorni, il campione PCL/HA 50/50 ha mostrato l'aumento in peso più significativo, suggerendo una maggiore mineralizzazione. Infatti anche le misure termogravimetriche mostrano che la composizione del composito è significativamente cambiata, rivelando un arricchimento nella componente apatitica. A questo proposito, deve essere sottolineato che l'aumento di peso misurato per questi campioni rappresenta la somma di due fenomeni opposti: la perdita di peso dovuta alla degradazione della componente polimerica e il guadagno in peso dovuto alla deposizione di fase apatitica. Da questi dati non si può però affermare che il PCL/HA 50/50 sia il campione che si è maggiormente mineralizzato. Un dato utile a chiarire questo problema può giungere dal DSC: infatti gli andamenti relativi di cristallinità e frazione cristallizzabile sono simili per tutti e tre i compositi in SBF per 56 giorni (con valori di cristallinità ovviamente maggiori per PCL/HA 50/50), suggerendo che tutti i campioni hanno subito una degradazione della componente polimerica molto simile in questo mezzo. Si può quindi ragionevolmente ipotizzare che il campione con il maggiore contenuto di HA sia quello con la maggiore capacità di nucleare una nuova fase apatitica. La deposizione di una fase apatitica è stata confermata dallo spettro Raman del PCL/HA 50/50: lo spettro mette in evidenza un aumento delle bande di HA rispetto a quelle del PCL (in particolare aumenta significativamente il rapporto I_{963}/I_{1723}). Gli spettri mostrati sono relativi alla superficie del campione, ma si può affermare che un analogo andamento si può osservare anche all'interno del campione grazie alle misure di termogravimetria che sono condotte sul bulk del materiale.

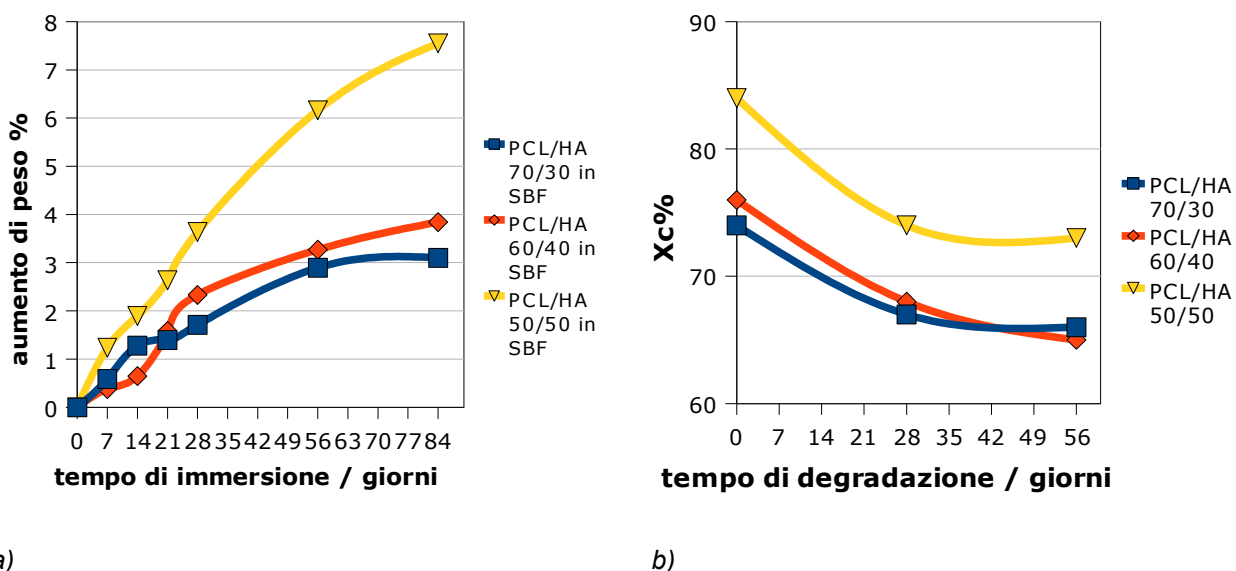


Figura 12: andamento dell'aumento di peso (a) e del grado di cristallinità (b) dei campioni immersi in SBF.

CAMPIONE	CRISTALLINITA' (X _c %)	FRAZIONE CRISTALLIZZABILE (CF%)	% HA (w/w)
PCL/HA 70/30, non degradato	70	64	25
PCL/HA 70/30, 28 giorni	67	82	29
PCL/HA 70/30, 56 giorni	66	72	31
PCL/HA 60/40, non degradato	76	65	40
PCL/HA 60/40, 28 giorni	68	86	42
PCL/HA 60/40, 56 giorni	65	82	46
PCL/HA 50/50, non degradato	84	62	50
PCL/HA 50/50, 28 giorni	74	74	53
PCL/HA 50/50, 56 giorni	73	68	57

Tabella 4: variazioni morfologiche osservate nei diversi campioni dopo 28 e 56 giorni di immersione in SBF. Si può notare che tutti mostrano un aumento del contenuto di HA.

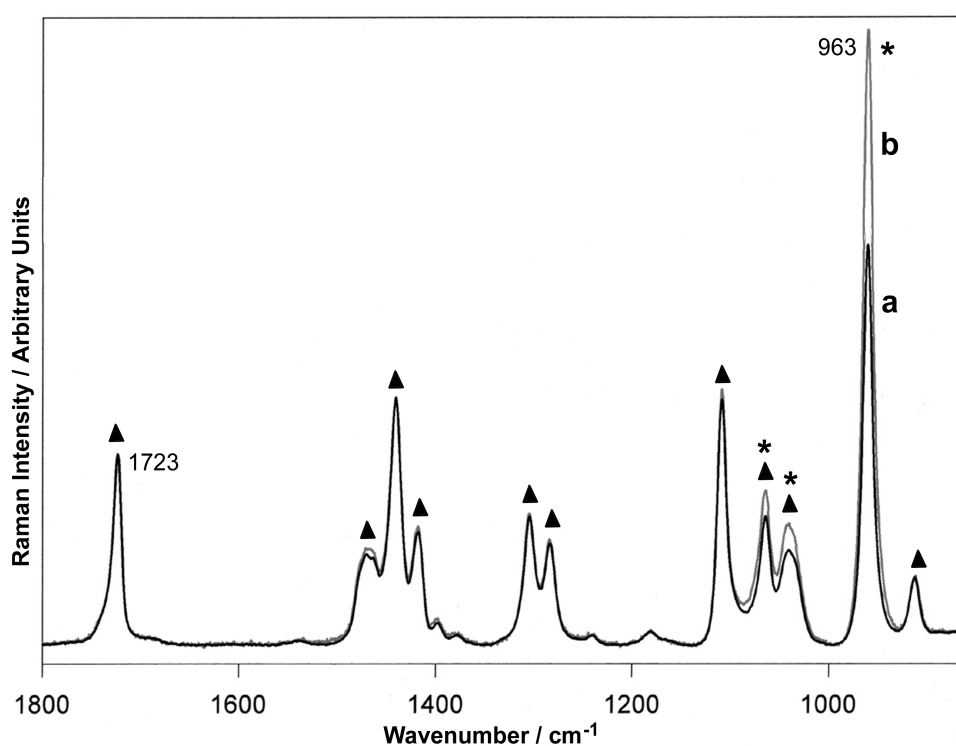


Figura 13: spettri Raman della superficie del composito PCL/HA 50/50 prima (a) e dopo (b) immersione per 56 giorni in SBF. Gli spettri sono normalizzati rispetto alla banda a 1723 cm⁻¹. ▲: bande del PCL; *: bande di HA.

V – Test di coltura cellulare: dati termici e FT-Raman

In figura 13 si mostra lo spettro FT-Raman del PCL/HA 50/50 prima e dopo incubazione di 28 giorni con HOB. I marker della degradazione individuati nella larghezza a metà altezza della banda dello stretching C=O a 1724 cm^{-1} e il rapporto di intensità I_{1305}/I_{1284} non hanno mostrato variazioni significative, così come i rapporti I_{2918}/I_{771} e I_{1724}/I_{963} , utilizzati per valutare il rapporto PCL/HA. La variazione osservata nella banda di fluorescenza di HA a 771 cm^{-1} è stata considerata dovuta alla variabilità del campione.

Le analisi termiche hanno invece permesso di indagare le variazioni di composizione e di cristallinità. Non sono state rilevate variazioni di rilievo per quanto riguarda la composizione dei campioni. PCL/HA 70/30 e PCL/HA 60/40 non hanno subito un riarrangiamento strutturale nel mezzo di incubazione, mentre PCL/HA 50/50 e PCL puro mostrano un aumento del CF% legato alla diminuzione della lunghezza delle catene. Il PCL puro non ha mostrato ulteriori degradazioni con HOB, mentre PCL/HA 60/40 e PCL/HA 50/50 mostrano una diminuzione di cristallinità con andamento simile a quanto osservato nei diversi mezzi di degradazione a 28 giorni.

Le differenze notevoli mostrate dal campione di PCL/HA 70/30 incubato con HOB sono imputabili alla sua diversità rispetto agli altri compositi: già in precedenza si era sottolineato che provenisse da un diverso lotto di produzione e infatti questo campione mostrava inizialmente la cristallinità inferiore e il CF% maggiore rispetto a tutti gli altri compositi. Queste diverse caratteristiche iniziali sono invece variate durante l'incubazione con HOB: la cristallinità è aumentata, mentre il CF% è diminuito, indicando che la degradazione ha coinvolto preferenzialmente i domini amorfi e le catene polimeriche più corte.

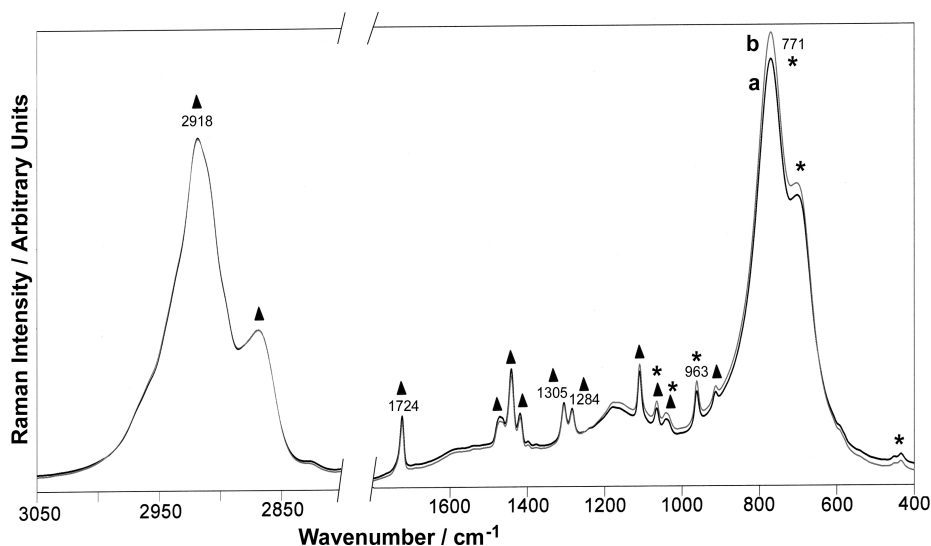


Figura 14: spettri FT-Raman del campione PCL/HA 50/50 prima (a) e dopo l'incubazione di 28 giorni con HOB (b). Gli spettri sono normalizzati rispetto alla banda a 2918 cm^{-1} . ▲: bande relative al PCL; *: bande relative ad HA.

CAMPIONE	CRISTALLINITA' (X _c %)	FRAZIONE CRISTALLIZZABILE (CF%)	% PCL (w/w)
PCL non degradato	71	65	100
PCL + mezzo di incubazione	72	72	100
PCL+HOB	72	75	100
PCL/HA 70/30 non degradato	69	88	76
PCL/HA 70/30 + mezzo di incubazione	69	88	77
PCL/HA 70/30 + HOB	76	61	77
PCL/HA 60/40 non degradato	76	65	60
PCL/HA 60/40 + mezzo di incubazione	77	69	61
PCL/HA 60/40 + HOB	72	66	59
PCL/HA 50/50 non degradato	84	62	50
PCL/HA 50/50 + mezzo di incubazione	82	59	51
PCL/HA 50/50 + HOB	72	71	51

Tabella 5: proprietà morfologiche dei campioni incubati con HOB.

VI - Campioni irraggiati con raggi- γ a 50 kGy

L'analisi termica dei campioni irraggiati a 50 kGy ha mostrato che le radiazioni non hanno indotto cambiamenti rilevanti sulla morfologia della componente polimerica del materiale, anche nel caso in cui l'irraggiamento è stato eseguito in aria. In particolare, le differenze riscontrate nella cristallinità del PCL sono poco significative (dell'ordine del 2-3%) ed essenzialmente attribuibili all'anisotropia del materiale.

L'andamento della frazione cristallizzabile (figura 14) merita una discussione più dettagliata: tutti i campioni infatti mostrano un aumento della CF% dopo irraggiamento: il PCL puro, PCL/HA 60/40 e PCL/HA 50/50 mostrano le variazioni più significative. Questi risultati, supportati dalla diminuzione della temperatura di fusione di circa 1°C e dal contemporaneo aumento della temperatura di cristallizzazione (nell'intervallo 0.5-2°C) suggeriscono una piccola diminuzione della lunghezza delle catene polimeriche: infatti un polimero semicristallino con lunghezza di catena inferiore può fondere a temperature inferiori e cristallizzare a temperature superiori grazie alla maggiore mobilità molecolare.

Questi risultati sono in accordo con articoli precedenti nei quali è stato osservato che omopolimeri come PCL e PLA degradano attraverso reazioni di accorciamento di catena a basse dosi di raggi- γ [47, 48], mentre una variazione casuale della cristallinità del PCL e un aumento dell'energia di cristallizzazione causati da un aumento del grado di cross-linking delle catene sono stati osservati

per dosi superiori a 100 kGy [17, 25]. Questo comportamento è dovuto al fatto che durante l'irraggiamento si formano radicali liberi nel materiale polimerico; tali composti molto reattivi inducono una diminuzione della lunghezza della catena agendo sul legame esterico, che è il sito più sensibile alla rottura. [47, 48].

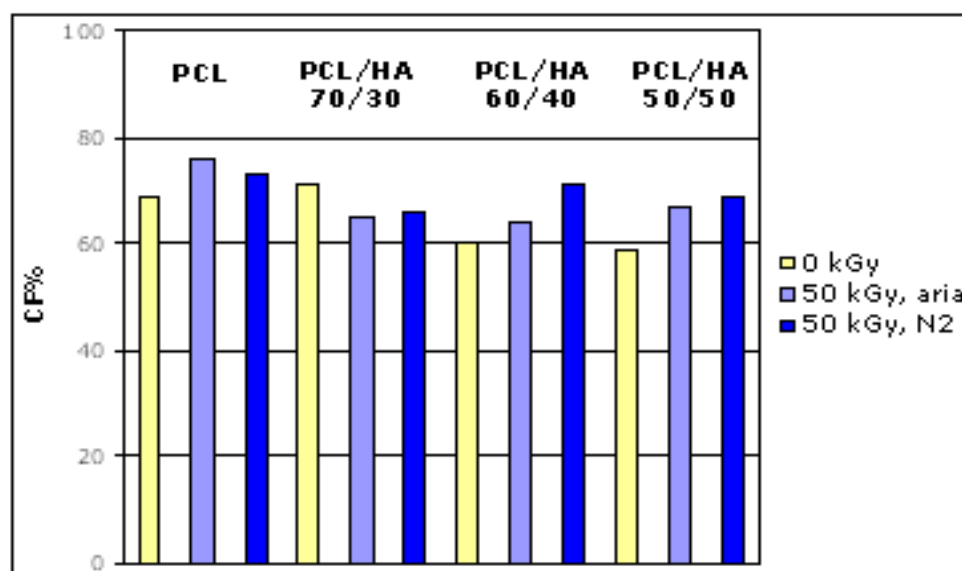


Figura 15: andamento della frazione cristallizzabile prima e dopo l'irraggiamento nei diversi campioni esaminati

Le piccole variazioni osservate con le tecniche termiche sono state confermate dall'analisi spettroscopica.

Gli spettri IR (figura 15 A) dei campioni irraggiati non hanno mostrato variazioni significative nella larghezza delle bande attribuite ai domini del PCL cristallino (ν C=O e ν C-O-C). Inoltre, il rapporto di intensità tra le bande a 1721 cm^{-1} (ν C=O) e 565 cm^{-1} (ν PO₄), indice del rapporto tra PCL e HA, non è variato. Sono stati registrati anche alcuni spettri dell'idrossiapatite utilizzata per la sintesi del biomateriale per indagare l'eventuale variazione del contenuto di carbonato nel reticolo di HA: lo ione carbonato infatti può dare origine a radicali liberi se sottoposto ad irraggiamento. Il rapporto delle aree delle bande IR di vibrazione dello ione carbonato a 875 cm^{-1} e quella dello ione fosfato a 565 cm^{-1} non è variato dopo l'irraggiamento, escludendo la variazione del rapporto tra ione carbonato e fosfato. Le uniche differenze osservate riguardano la semilarghezza della banda intorno a 1020 cm^{-1} , attribuita principalmente allo stretching del gruppo fosfato, ma in cui cadono anche alcune bande della componente polimerica (figura 5): dopo irraggiamento si osserva un allargamento sensibile di questa banda, forse dovuto ad una minore cristallinità della componente apatitica. Tuttavia questa osservazione non è stata confermata dagli spettri Raman e non è rivelabile con le tecniche di analisi termica a causa dell'elevata temperatura di fusione di HA.

Gli spettri Raman (figura 15 B) hanno confermato i dati ottenuti con la tecnica IR. Sugli spettri

Raman è anche stata condotta un'analisi di tipo quantitativo, in particolare sul doppietto a $1305\text{-}1285\text{ cm}^{-1}$ relativo al modo di wagging del CH_2 e il cui rapporto di intensità è indice del rapporto tra domini amorfi e cristallini. Le due bande sono state fittate con due curve di tipo gaussiano: il rapporto tra le aree delle due bande non è variato dopo l'irraggiamento.

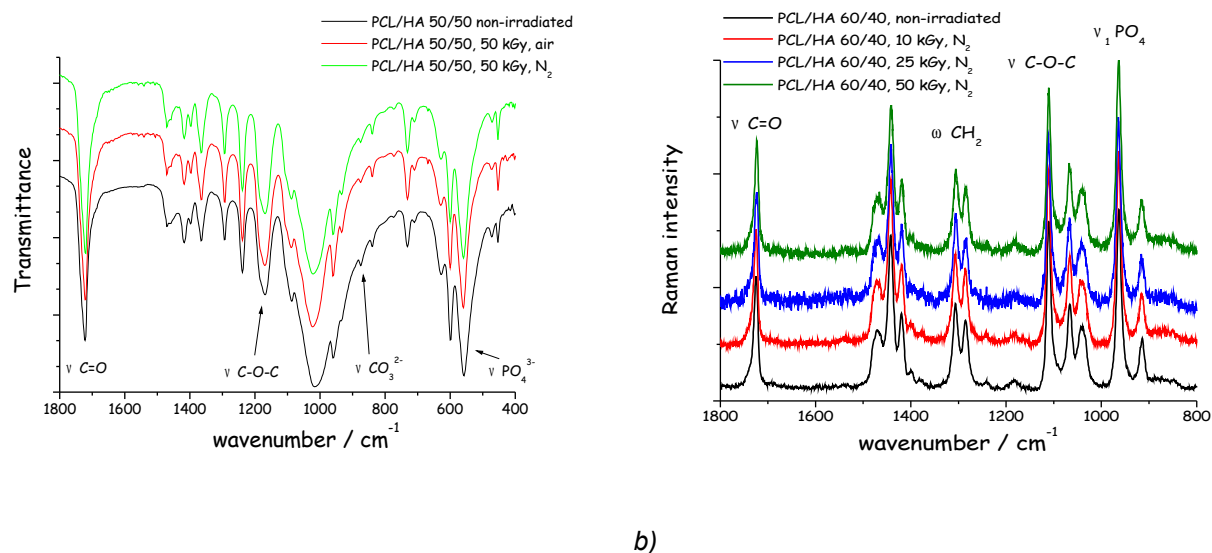


Figura 16: spettri FT-IR (a) e Raman (b) dei compositi prima e dopo irraggiamento a 50 kGy.

D – CONCLUSIONI

L'indagine sui compositi a base di PCL e HA ha mostrato che la modalità di sintesi ha influito sulla loro morfologia, causando un aumento di cristallinità in relazione all'aumento di fase inorganica utilizzata. Questa diversità iniziale ha influenzato anche la successiva degradazione in diverse soluzioni acquose, in particolare in soluzione alcalina: il campione con maggior contenuto di HA si degrada in maniera diversa rispetto agli altri compositi.

I campioni di composito incubati in SBF hanno dimostrato di possedere una buona capacità di mineralizzazione; il campione con deposizione di fase apatitica maggiore è il PCL/HA 50/50. Deve essere sottolineato che la porosità del campione ha permesso la deposizione di apatite anche all'interno del campione. La formazione di nuovo tessuto osseo da parte degli osteoblasti dovrebbe essere facilitata dalla presenza della fase apatitica che fornisce gli ioni per la mineralizzazione [49]. Le analisi sui campioni incubati hanno rivelato che le maggiori variazioni sulla componente polimerica sono dovute al mezzo di incubazione; il PCL/HA 70/30, con caratteristiche differenti, ma anche il PCL/HA 50/50, hanno mostrato una riorganizzazione strutturale dovuta all'azione delle cellule HOB. Risultati preliminari mostrano una buona osteoconduttività per questi compositi. [50-51]

Infine, i campioni hanno mostrato una buona resistenza alla sterilizzazione con dosi di raggi- γ superiori a quelle raccomandate per la sterilizzazione di dispositivi biomedicali, mostrando solo

piccole variazioni nella lunghezza della catena polimerica e di cristallinità della fase inorganica. Il composito è quindi adatto a questo tipo di processo di sterilizzazione.

Bibliografia

- [1] Burg K J L, Porter S, Kellam J F. Biomaterial developments for bone tissue engineering. *Biomaterials* 2000; 21: 2347-2359.
- [2] Chawla J S, Amiji M M. Biodegradable poly(ϵ -caprolactone) nanoparticles for tumor-targeted delivery of tamoxifen. *International Journal of Pharmacology* 2002; 249:127-138;
- [3] Kweon HY, Yoo M K, Park I K, Kim T H, Lee H C, Lee H-S, Oh J-S, Akaike T, Cho C-S. A novel degradable polycaprolactone networks for tissue engineering. *Biomaterials* 2003; 24:801-808.
- [4] Corden T J, Jones I A, Rudd C D, Christian P, Downes S, McDougall K E. Physical and biocompatibility properties of poly- ϵ -caprolactone produced by *in situ* polymerisation: a novel manufacturing technique for long-fibre composite. *Biomaterials* 2000; 21: 713-724.
- [5] Agrawal C M, Ray R B. Biodegradable polymeric scaffolds for musculoskeletal tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research* 2001; 55: 141-150.
- [6] Guarino V, Causa F, Ambrosio L. Bioactive scaffolds for connective tissue regeneration. *Expert Review of Medical Devices* 2007; 4: 406-18.
- [7] Ciapetti G, Ambrosio L, Savarino L, Granchi D, Cenni E, Baldini N, Pagani S, Guizzardi S, Causa F, Giunti A. Osteoblast growth and function in porous poly epsilon-caprolactone matrices for bone repair: a preliminary study. *Biomaterials* 2003; 24: 3815-24.
- [8] Ang K C, Leong K F, Chua C K, Chandrasekaran M. Compressive properties and degradability of poly(ϵ -caprolactone)/hydroxyapatite composites under accelerated hydrolytic degradation. *Journal of Biomedical Materials Research* 2007; 80A: 655–660.
- [9] Rizzi S C, Heath D J, Coombes A G A, Bock N, Textor M, Downes S. Biodegradable polymer/hydroxyapatite composites: Surface analysis and initial attachment of human osteoblasts. *Journal of Biomedical Materials Research* 2001;55:475–486.
- [10] Chim H, Hutmacher D W, Chou A M, Oliveira A L, Reis R L, Lim T C, Schantz J T. A comparative analysis of scaffold material modifications for load-bearing applications in bone tissue engineering. *International Journal of Oral Maxillofacial Surgery* 2006; 35: 928–34.
- [11] Wu L, Zhang H, Zhang J, Ding J. Fabrication of Three-Dimensional Porous Scaffolds of Complicated Shape for Tissue Engineering. I. Compression Molding Based on Flexible–Rigid Combined Mold. *Tissue Engineering* 2005; 11: 1105-1114.
- [12] Verma D, Katti K, Katti D. Experimental investigation of interfaces in hydroxyapatite/polyacrylic acid/polycaprolactone composites using photoacoustic FTIR spectroscopy. *Journal of Biomedical Materials Research A* 2006; 77A: 59-66.
- [13] Verma D, Katti K, Katti D. Bioactivity in *in situ* hydroxyapatite-polycaprolactone composites. *Journal of Biomedical Materials Research A* 2006; 78A: 772-780.
- [14] Kim H W, Knowles J C, Kim H E. Hydroxyapatite porous scaffold engineered with biological

polymer hybrid coating for antibiotic Vancomycin release. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 2005; 16: 189-195.

[15] Wiria F E, Leong K F, Chua C K, Liu Y. Poly-ε-caprolactone/hydroxyapatite for tissue engineering scaffold fabrication via selective laser sintering. *Acta Biomaterialia* 2007; 3: 1-12.

[16] Wein N A, Buchana, F J, Orra J F, Farrar, D F, Boyd A. Processing, annealing and sterilisation of polyL-lactide. *Biomaterials* 2004; 25: 3939-349.

[17] Gogolewski S, Mainil-Vartlet P, Dillon J G. Sterility, mechanical properties, and molecular stability of polylactide internal-fixation devices treated with low temperature plasmas. *Journal of Biomedical Materials Research* 1996; 50: 410-419.

[18] Hilmy, Febrida, Basril, Experiences using IAEA Code of practice for radiation sterilization of allografts: Validation and routine control. *Radiation Physics and Chemistry* 2007; 76: 1751-1755.

[19] Nguyen, Morgan, Forwood,. Sterilization of allograft bone: is 25 kGy the gold standard for gamma irradiation? *Cell Tissue Banking* 2007; 8: 81-91

[20] Zimek, Kaluska. Sterilization dose auditing for various types of medical products. *Radiation Physics and Chemistry* 2002; 63: 673-674

[21] Chen B, Sun K. Poly-(ε-caprolactone)/hydroxyapatite composites: effects of particle size, molecular weight distribution and irradiation on interfacial interaction and properties. *Polymer Testing* 2005; 24: 64-70.

[22] Gorna K, Gogolewski S. The effect of gamma radiation on molecular stability and mechanical properties of biodegradable polyurethanes for medical applications. *Polymer Degradation and Stability* 2003; 79: 465-474.

[23] Masson V, Maurin F, Fessi H, Devissaguet J P. Influence of sterilization processes on poly(ε-caprolactone) nanospheres. *Biomaterials* 1997; 18: 327-335.

[24] Rouxhet L, Legras R. Modifications induced by swift heavy ions in poly(hydroxybutyrate-hydroxyvalerate) (PHB/HV) and poly(ε-caprolactone) (PCL) films. Part 1. Thermal behaviour and molecular mass modifications. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B* 2000; 171: 487-498.

[25] Zhu G, Xu Q, Qin R, Yan H, Liang G. Effect of γ-radiation on crystallization of polycaprolactone. *Radiation Physics and Chemistry* 2005; 74: 42-50.

[26] Reggiani M, Taddei P, Tinti A, Fagnano C. Spectroscopic study on the enzymatic degradation of a biodegradable composite periodontal membrane. *Biopolymers* 2004; 74: 146-150.

[27] Kowalski J B, Herring C, Baryschpolec L, Reger J, Patel J, Feeney M, Tallentire A. Field evaluations of the VDmax approach for substantiation of a 25 kGy sterilization dose and its application to other preselected doses. *Radiation Physics and Chemistry* 2002; 64: 411-416

[28] Taddei P, Simoni R, Fini G. Spectroscopic study on the *in vitro* degradation of a biodegradable composite periodontal membrane. *Journal of Molecular Structure* 2001; 565-566: 317-322.

[29] Taddei P, Tinti A, Fini G. Vibrational spectroscopy of polymeric biomaterials. *Journal of Raman Spectroscopy* 2001; 32: 619-629.

- [30] Taddei P, Monti P, Simoni R. Vibrational and thermal study on the *in vitro* and *in vivo* degradation of a bioabsorbable periodontal membrane: Vicryl Periodontal Mesh (Polyglactin 910). *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 2002;13: 59-64.
- [31] Taddei P, Monti P, Simoni R. Vibrational and thermal study on the *in vitro* and *in vivo* degradation of a poly(lactic acid)-based bioabsorbable periodontal membrane. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 2002; 13: 469-475.
- [32] Taddei P, Tinti A, Reggiani M, Fagnano C. *In vitro* mineralization of bioresorbable poly(ϵ -caprolactone)/apatite composites for bone tissue engineering: a vibrational and thermal investigation. *Journal of Molecular Structure* 2005; 744-747: 135-143.
- [33] Guarino V, Gloria A, Causa F, De Santis R, Ambrosio L. Scaffolds for connective tissue regeneration. *Biomedical Pharmacotherapy* 2006; 60:471.
- [34] Kokubo T, Kushitani H, Sakka S, Kitsugi T, Yamamuro T. Solutions able to reproduce *in vivo* surface-structure changes in bioactive glass-ceramic A-W. *Journal of Biomedical Materials Research* 1990; 24: 721-34.
- [35] Tsuda H, Arias J, Leon B, Arends J, Necessary Precautions in the Raman Analysis of Calcium Phosphate Minerals Using 1.06 μm YAG Laser Excitation. *Applied Spectroscopy* 1998; 52: 1122-1126.
- [36] Crescenzi V, Manzini G, Calzolari G, Borri C. *European Polymer Journal* 1972; 8: 449-.
- [37] Kister G, Cassanas G, Bergounhon M, Hoarau D, Vert M. Structural characterization and hydrolytic degradation of solid copolymers of DL-lactide-co- ϵ -caprolactone by Raman spectroscopy. *Polymer* 2000; 41: 925-932.
- [38] Baji A, Wong S C, Liu T, Li T, Srivatsan T S. Morphological and X-ray studies of crystalline hydroxyapatite-reinforced polycaprolactone. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 2007; 81B: 343-350.
- [39] Nelson D G A, Featherstone J D B. Preparation, analysis, and characterization of carbonated apatites. *Calcified Tissue International* 1982; 34: S69-S81.
- [40] Featherstone J D B, Pearson S, Le Geros R Z. An infrared method for quantification of carbonate in carbonated apatites. *Caries Reserches* 1984; 18: 63-66.
- [41] Cam D, Hyon S H, Ikada Y. Degradation of high molecular weight poly(L-lactide) in alkaline medium. *Biomaterials* 1995; 16: 833-843.
- [42] Beck L R, Tice T R, in D R Miscell (Ed.), *Advances in Human Fertility and Reproductive Endocrinology*, Vol. 2, Long Acting Steroid Contraception, Raven Press, New York, NY, 1983, p. 175.
- [43] Makino K, Ohshima H, Kondo T. Mechanism of hydrolytic degradation of poly(L-lactide) microcapsules: effects of pH, ionic strength and buffer concentration. *Journal of Microencapsulation* 1986; 3: 203-212.
- [44] Fischer E W, Sterzel H J, Wegner G. Investigation of the structure of solution grown crystals of lactide copolymers by means of chemical reactions. *Kolloid-Z Polymer* 1973; 251: 980-990.

- [45] Li S, Garreau H, Vert M. Structure-property relationships in the case of the degradation of massive poly(α -hydroxy acids) in aqueous media. Part 3. Influence of the morphology of poly(L-lactic acid). *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 1990; 1: 198-206.
- [46] Azevedo M C, Reis R L, Claase M B, Grijpma D W, Feijen J. Development and properties of polycaprolactone/hydroxyapatite composite biomaterials. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 2003; 14: 103-107.
- [47] Narkin M, Sibony-Chaouat S, Siegmann A, Shkolnik S, Bell J P. Irradiation effects on polycaprolactone. *Polymer* 1985; 26: 50-54
- [48] Gupta M C, Deshmukh V G. Radiation effects on poly(lactic acid). *Polymer* 1983; 24, 827-830
- [49] R Z LeGeros, in H Myers Karger (Ed.), *Monographs in oral science*, Vol. 15, A.G. Publisher, Basel, 1991, p 82.
- [50] Taddei P, Tinti A, Reggiani M, Di Foggia M, Ciapetti G, Baldini N, Fagnano C, “*In vitro* biodegradation and osteoconductivity of poly(ϵ -caprolactone)/apatite scaffolds for bone repair” *Proceedings of the 19th European Conference on Biomaterials*, p 513.
- [51] Di Foggia M, Taddei P, Ciapetti G, Baldini N, Guarino V, Causa F, Ambrosio L, Fagnano C. Osteoblast induced biodegradation of poly(ϵ -caprolactone)-carbonated apatite composites for bone tissue engineering. *Transactions of the 16th EORS Meeting*, p 161.

PEPTIDI AUTOASSEMBLANTI

A – INTRODUZIONE

I materiali biomimetici “replicano” i tessuti e i sistemi biologici naturali per suscitare le risposte cellulari appropriate per la rigenerazione dei tessuti e per dirigere la formazione di nuovi tessuti intorno al materiale nel sito di impianto.

Nell'osso, la matrice extra-cellulare è sintetizzata e arrangiata in maniera specifica dagli osteoblasti. La formazione di un legame tra i recettori delle integrine e le sequenze arginina-glicina-acido aspartico (RGD) delle glicoproteine anioniche causa l'interazione tra gli osteoblasti e le fibre di collagene di tipo I. Tra le differenti tecniche adottate per replicare queste interazioni, l'adsorbimento di peptidi sintetici RGD sulla superficie dei biomateriali può essere utilizzata per controllare la bioattività dei materiali usati per la rigenerazione dell'osso (in particolare per l'adesione degli osteoblasti), poiché questi peptidi sintetici sono modulatori attivi dell'adesione delle cellule e possono guidare la loro crescita, portando alla rigenerazione *in situ* di osso e cartilagine.

Gli articoli apparsi sui peptidi RGD negli ultimi anni sono piuttosto numerosi [1-6], ma l'interesse nei materiali funzionalizzati biomimetici ha condotto a nuovi studi su oligopeptidi a struttura regolare e alternata di residui polari e non polari, come l'EAK-16 (analogo di peptidi scoperti in alcuni lieviti) sintetizzato da Zhang [7-10] e poi studiato da altri gruppi di ricerca [6, 11-12]. Questa classe di oligopeptidi ha una struttura preferenziale di tipo β -sheet, è resistente all'idrolisi del legame peptidico e può autoassemblare per formare delle membrane macroscopiche insolubili. Queste proprietà derivano dalle interazioni idrofobiche tra i gruppi CH_3 dei residui non ionici e dalla formazione di legami ionici tra amminoacidi acidi e basici; la stabilità di queste strutture può essere aumentata con un'appropriata regolazione del pH e con l'aggiunta di ioni metallici monovalenti.

Si sono studiati otto diversi oligopeptidi (contenenti 16-19 residui) derivati dall'EAK-16, ma con struttura primaria modificata, per valutare l'influenza della sequenza sulla struttura secondaria. Lo scopo finale di questo studio è la messa a punto di dispositivi biomedici per l'ingegneria tissutale ossea, costituiti da superfici di TiO_2 (un materiale comunemente utilizzato nelle protesi ossee) ricoperte da uno strato autoassemblato di oligopeptidi. La formazione di questi strati è sensibile alla struttura secondaria del peptide: infatti, è ben noto che strutture β -sheet favoriscono la formazione di strati e fibre su superfici solide [12, 13]. Due peptidi tra quelli analizzati contengono la sequenza RGD all'estremità N-terminale, per investigare l'influenza di questa sequenza biologicamente attiva sulla struttura del peptide.

A partire dagli anni '70, un rilevante numero di studi ha sottolineato che le spettroscopie vibrazionali IR e Raman possono essere dei validi strumenti per ricavare informazioni qualitative e quantitative sulla struttura secondaria di peptidi e proteine, attraverso l'analisi dei modi di vibrazione del gruppo ammidico. In questa ricerca, queste due tecniche sono state usate per chiarire

la conformazione di questi peptidi e i loro cambiamenti dopo solubilizzazione in tampone fosfato in presenza di NaCl e successiva liofilizzazione. In figura 1 è mostrato un confronto tra gli spettri IR e Raman del peptide 1, con evidenziate le principali bande di ogni spettro: come si può notare le informazioni derivanti dalle due tecniche sono complementari e permettono di caratterizzare in maniera precisa la struttura del peptide; questa complementarietà proviene dalle diverse regole di selezione proprie delle due tecniche spettroscopiche: la variazione di momento di dipolo in IR e la variazione della polarizzabilità in spettroscopia Raman.

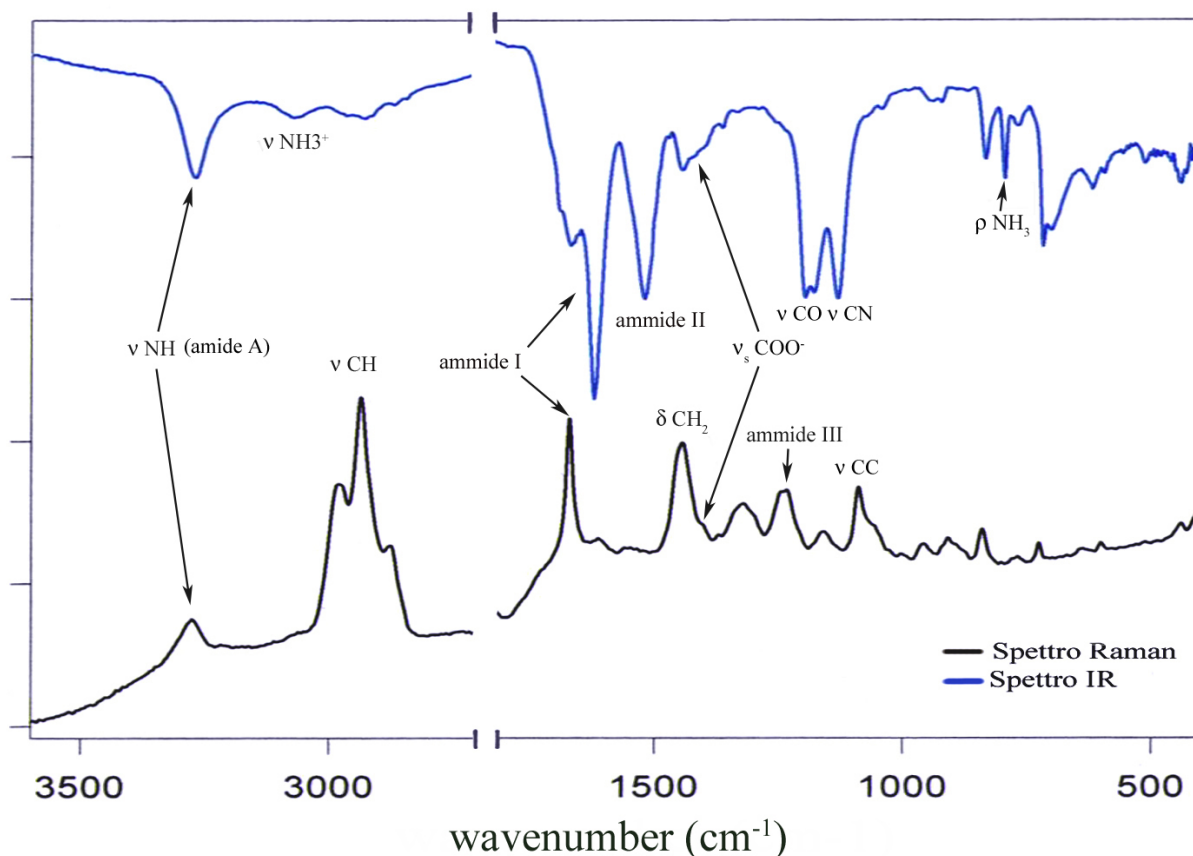


Figura 1: lo spettro Raman e quello IR dello stesso peptide (peptide 1) danno informazioni complementari sulla struttura secondaria del peptide e sulla presenza di gruppi carichi. In generale, negli spettri IR si osservano meglio i modi di vibrazione che coinvolgono legami polari (C-O; C-N), mentre in Raman sono più intensi i modi dei legami meno polari (C-H).

In figura 2, sono mostrati i principali tipi di struttura secondaria: β -sheet (a), α -elica (b) e β -turn (c). La formazione di un particolare tipo di struttura dipende dal numero di legami ad idrogeno disponibili e dalle interazioni tra catene laterali. I peptidi analizzati hanno una struttura primaria molto regolare e ripetitiva che favorisce la formazione di motivi strutturali di tipo β molto stabili grazie alla formazione di legami ad idrogeno di media forza e alle interazioni elettrostatiche tra catene laterali cariche e alle interazioni idrofobiche tra catene laterali alchiliche.

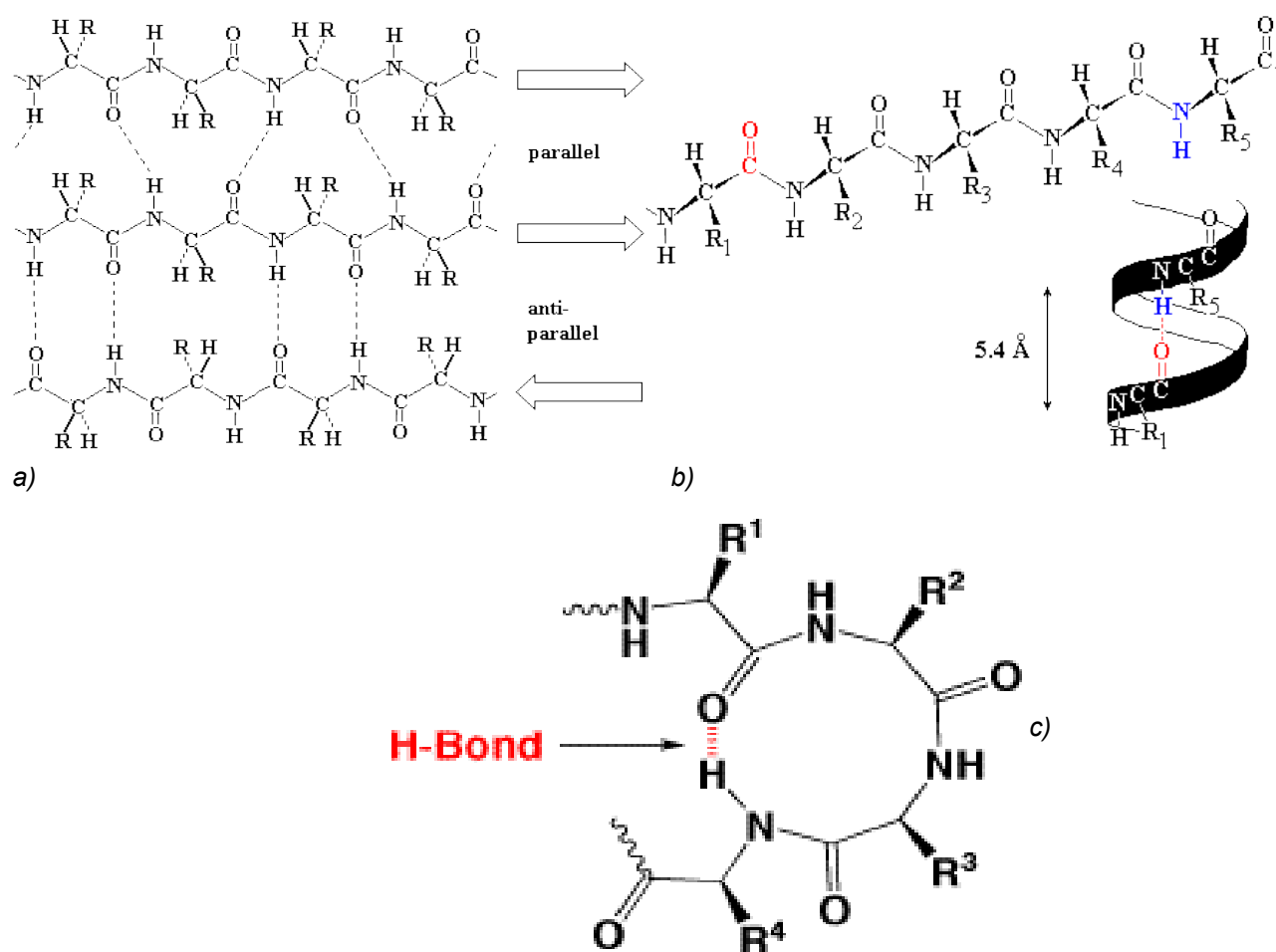


Figura 2: rappresentazione schematica del β -sheet parallelo e antiparallelo (a); dell' α -elica (b) e del β -turn (c)

B – MATERIALI E METODI

La tabella 1 mostra le sequenze dei peptidi analizzati: all'estremità C-terminale della catena tutti i peptidi terminano con un gruppo ammidico anziché con il gruppo carbossilico, sostituzione che però non ha influenza sulla capacità di formare le membrane, ma dipende solo dalla sintesi. [7]

I peptidi sono stati sintetizzati presso il Dipartimento di Processi Chimici dell'Ingegneria dell'Università di Padova dal gruppo di ricerca della prof.ssa Dettin, con un metodo a fase solida con un sintetizzatore automatico di peptidi (Applied Biosystems, Modello 431A) utilizzando il gruppo protettivo Fmoc. I peptidi appena sintetizzati sono stati purificati tramite HPLC (High-Performance Liquid Chromatography). L'omogeneità dei peptidi è stata valutata tramite cromatografia, elettroforesi capillare e spettrometria di massa (ESI-TOF). Il grado di purezza è compreso tra il 95% e il 99%. In tabella 2 sono riportate le strutture degli amminoacidi utilizzati nella sintesi dei peptidi.

Per studiare i cambiamenti conformazionali dei peptidi e la loro capacità di formare strutture

autoassemblanti, 1 mg di oligopeptide è stato disciolto in 1 mL di tampone fosfato salino (150 mM NaCl + 0.5 mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄, pH 7.4). Le soluzioni sono state tenute a temperatura ambiente per 6 ore, poi refrigerate a -80°C e liofilizzate. La stessa soluzione è stata utilizzata anche per solubilizzare i peptidi per la deposizione su titanio. Tutti i peptidi sono stati analizzati sia dopo la sintesi, sia dopo il trattamento di solubilizzazione e liofilizzazione.

PEPTIDE	STRUTTURA PRIMARIA	DIFFERENZE RISPETTO A EAK-16
1	H-Ala-Glu-Ala-Glu-Ala-Lys-Ala-Lys-Ala-Glu-Ala-Glu-Ala-Lys-Ala-Lys-NH ₂	
2	H-Ala-Asp-Ala-Asp-Ala-Lys-Ala-Lys-Ala-Asp-Ala-Asp-Ala-Lys-Ala-Lys-NH ₂	Asp ↔ Glu
3	H-Ala-Glu-Ala-Glu-Ala-Orn-Ala-Orn-Ala-Glu-Ala-Glu-Ala-Orn-Ala-Orn-NH ₂	Orn ↔ Lys
4	H-Ala-Asp-Ala-Asp-Ala-Orn-Ala-Orn-Ala-Asp-Ala-Asp-Ala-Orn-Ala-Orn-NH ₂	Asp ↔ Glu Orn ↔ Lys
5	H-Abu-Glu-Abu-Glu-Abu-Lys-Abu-Lys-Abu-Glu-Abu-Glu-Abu-Lys-Abu-Lys-NH ₂	Abu ↔ Ala
6	H-Tyr-Glu-Tyr-Glu-Tyr-Lys-Tyr-Lys-Tyr-Glu-Tyr-Glu-Tyr-Lys-Tyr-Lys-NH ₂	Tyr ↔ Ala
7	H-Arg-Gly-Asp-Ala-Glu-Ala-Glu-Ala-Lys-Ala-Lys-Ala-Glu-Ala-Glu-Ala-Lys-NH ₂	Pept 1+ RGD
8	H-Arg-Gly-Asp-Ala-Ala-Lys-Ala-Glu-Ala-Glu-Ala-Ala-Glu-Lys-Ala-Lys-Ala-Glu-Lys-NH ₂	Sequenza non regolare + RGD

Tabella 1: sequenze degli otto peptidi analizzati; sebbene la struttura primaria sia sempre diversa, è sempre rispettata l'alternanza tra amminoacidi polari e non polari (eccetto in peptide 8).

Gli spettri Raman sono stati registrati su uno spettrofotometro FT/IR-Raman IFS-66 con modulo Raman FRA 106, con detector di germanio reffreddato ad azoto liquido e con risoluzione spettrale di 4 cm⁻¹. Si è usato un laser a Nd³⁺-YAG (1064 nm, potenza sul campione di circa 100 mW) in configurazione back scattering (180°).

Gli spettri IR sono stati registrati su uno strumento Nicolet 5700 in modalità ATR su cristallo di diamante e detector DTGS. La tecnica ATR è stata scelta per le sue caratteristiche non-distruttive e

adatte alla caratterizzazione superficiale dei campioni (il raggio penetra nel materiale per circa 5 μm ; cfr capitolo tecniche). Gli spettri dei peptidi depositati sulla superficie di titanio poroso ossidato sono stati registrati con un microscopio IR Continuum collegato allo spettrometro FT-IR, dotato di telecamera e detector MCT raffreddato ad azoto liquido. Per ottenere degli spettri micro-IR con un buon rapporto segnale rumore, ogni spettro è la media di 200 accumuli. Sia gli spettri in modalità ATR, sia in modalità Micro, hanno la medesima risoluzione spettrale di 4 cm^{-1} . Sebbene queste due tecniche sfruttino il medesimo principio fisico (assorbimento IR), gli spettri ottenuti non possono essere confrontabili nella regione a bassi numeri d'onda ($> 1000 \text{ cm}^{-1}$) poiché l'assorbimento sul cristallo di ATR dipende dall'indice di rifrazione che può variare con la frequenza della luce e quindi influenzare l'intensità delle bande.

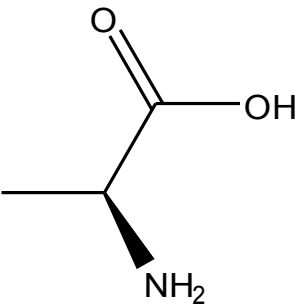
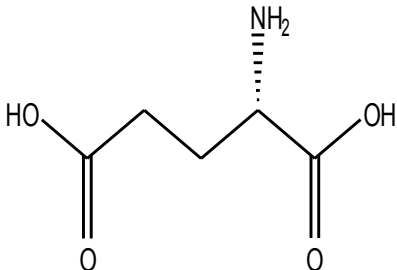
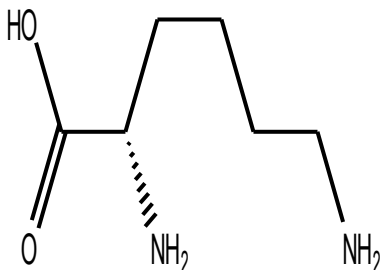
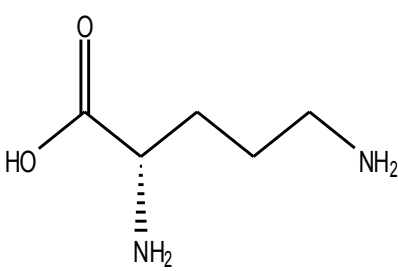
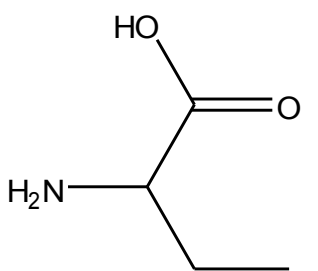
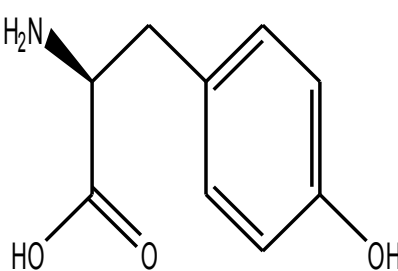
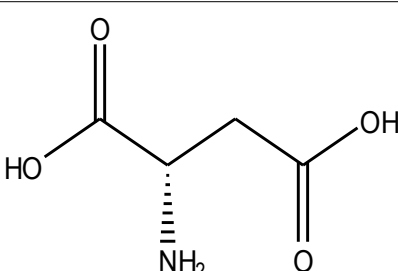
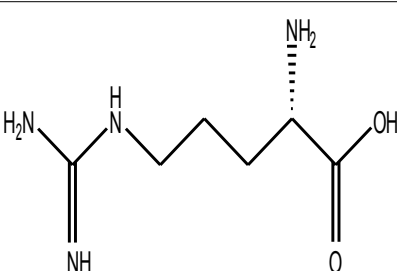
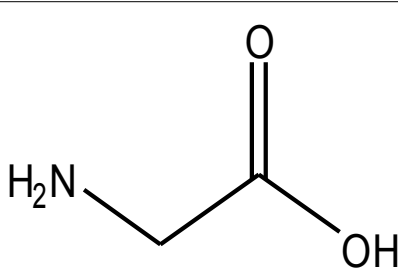
 <p>Alanina (ALA)</p>	 <p>Acido glutammico (GLU)</p>	 <p>Lisina (LYS)</p>
 <p>Ornitina (ORN)</p>	 <p>Acido 2-amminobutirrico (ABU)</p>	 <p>Tirosina (TYR)</p>
 <p>Acido aspartico (ASP)</p>	 <p>Arginina (ARG)</p>	 <p>Glicina (GLY)</p>

Tabella 2: strutture degli amminoacidi utilizzati nel presente studio.

In figura 3 sono mostrati alcuni dei modi di vibrazione tipici del legame peptidico. Il modo relativo all'ammide I ha buona intensità sia nello spettro IR, che nello spettro Raman (in cui però la

larghezza della banda risultante è inferiore e quindi più semplice da interpretare), mentre gli altri due modi sono intensi solo in IR (ammide II) o in Raman (ammide III).

Nella figura 4 è presentato lo schema delle attribuzioni relative alle diverse strutture secondarie a partire dai modi di vibrazione delle ammidi. Come si può notare, gli spettri IR possono fornire indicazioni più dettagliate rispetto agli spettri Raman: questo deriva anche dal fatto che il numero di studi di struttura proteica condotti con la spettroscopia IR sono molto superiori a quelli che utilizzano degli spettri Raman.

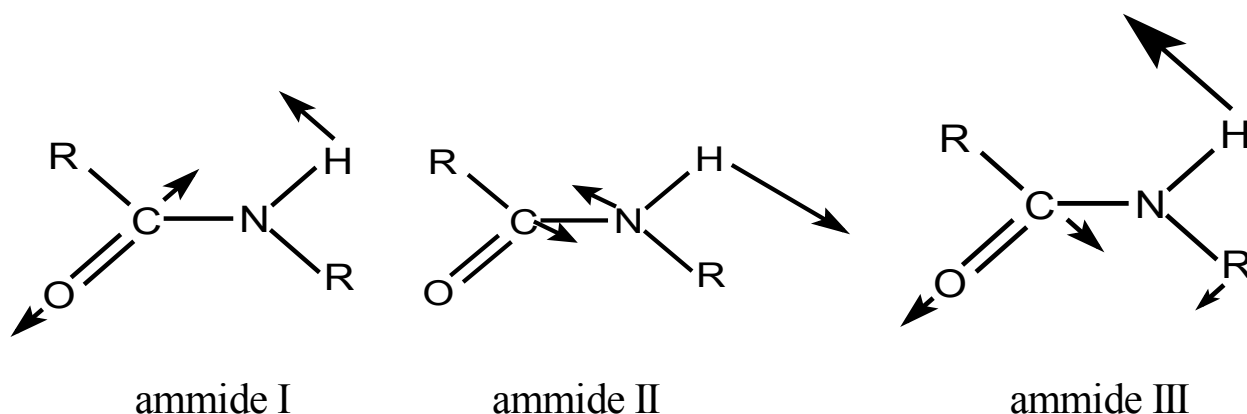


Figura 3: modi di vibrazione del legame peptidico sensibili alla struttura secondaria.

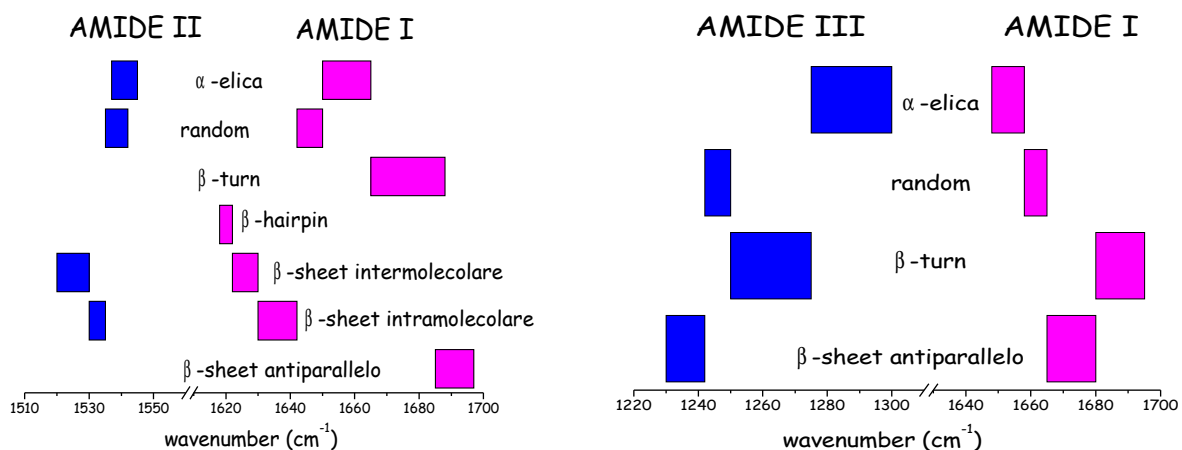


Figura 4: schemi delle attribuzioni delle differenti strutture secondarie nelle regioni amide II e amide I degli spettri IR (sx) e amide III e amide I degli spettri Raman (dx)

Per la determinazione quantitativa della struttura secondaria, la regione Raman ammidio I è stata analizzata con il metodo proposto da Alix [14] e con il curve-fitting.

Il primo metodo si basa sul calcolo di alcuni parametri spettroscopici della banda ammidio I dello

spettro Raman: la posizione e la larghezza della banda sono utilizzati per calcolare in maniera diretta la composizione percentuale della struttura secondaria attraverso alcuni coefficienti (tipici per ogni tipo di struttura secondaria) ricavati dal confronto tra gli spettri Raman e i dati di struttura delle proteine ottenuti con la diffrazione a raggi X. In figura 5 si mostrano le curve di correlazione ottenute per i quattro tipi di strutture secondarie (α -elica, β -sheet, β -turn e random) e la tabella con i coefficienti da esse derivate.

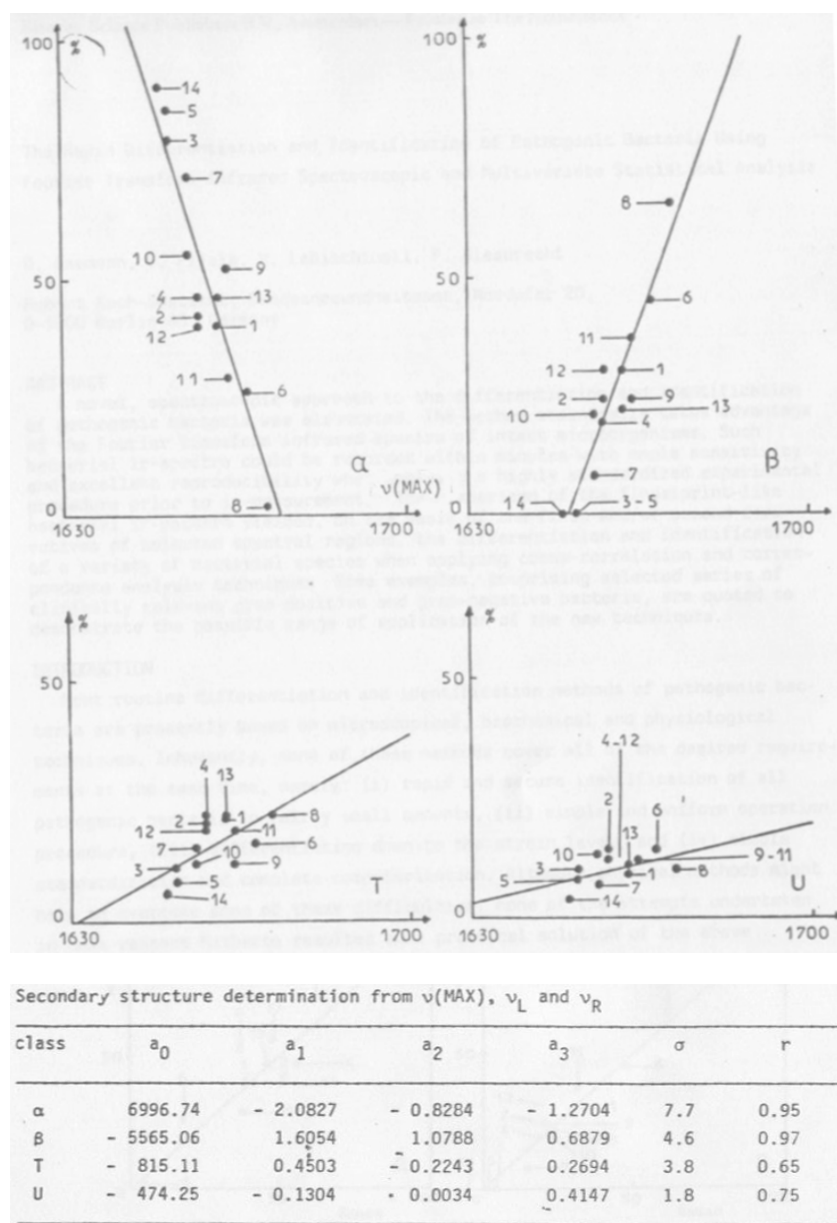


Figura 5: metodo di Arix: in alto sono mostrati i grafici di correlazione tra i dati Raman e i dati di diffrazione a raggi X per le quattro principali strutture secondarie (la correlazione ideale è rappresentata dalle rette); in basso sono mostrati i coefficienti ricavati dalle rette di correlazione.

Nella procedura di curve fitting si utilizza la derivata seconda degli spettri Raman nella regione dell'amide I per definire il numero e la posizione delle componenti del picco. La procedura di fitting permette di calcolare l'altezza e la larghezza di queste componenti minimizzando la differenza tra la somma delle curve e lo spettro originale (figura 6). La procedura di fitting è stata eseguita con software commerciali (Grams/32 AI 6.00 di Galactic) sugli spettri originali dopo la correzione della linea di base, usando l'algoritmo di Levenberg-Marquardt. Le componenti Raman sono state descritte come combinazioni lineari di funzioni gaussiane e lorentziane. Il contributo dei diversi tipi di struttura secondaria è stato calcolato dall'area delle singole bande ed espressa come frazione dell'area totale delle bande comprese tra 1640 e 1700 cm^{-1} . Il β -turn è stato calcolato dall'area delle bande a 1680 e 1690 cm^{-1} ; il β -sheet, le strutture disordinate e l' α -elica, sono state calcolate dall'area delle bande a 1670, 1660 e 1650 cm^{-1} , rispettivamente.

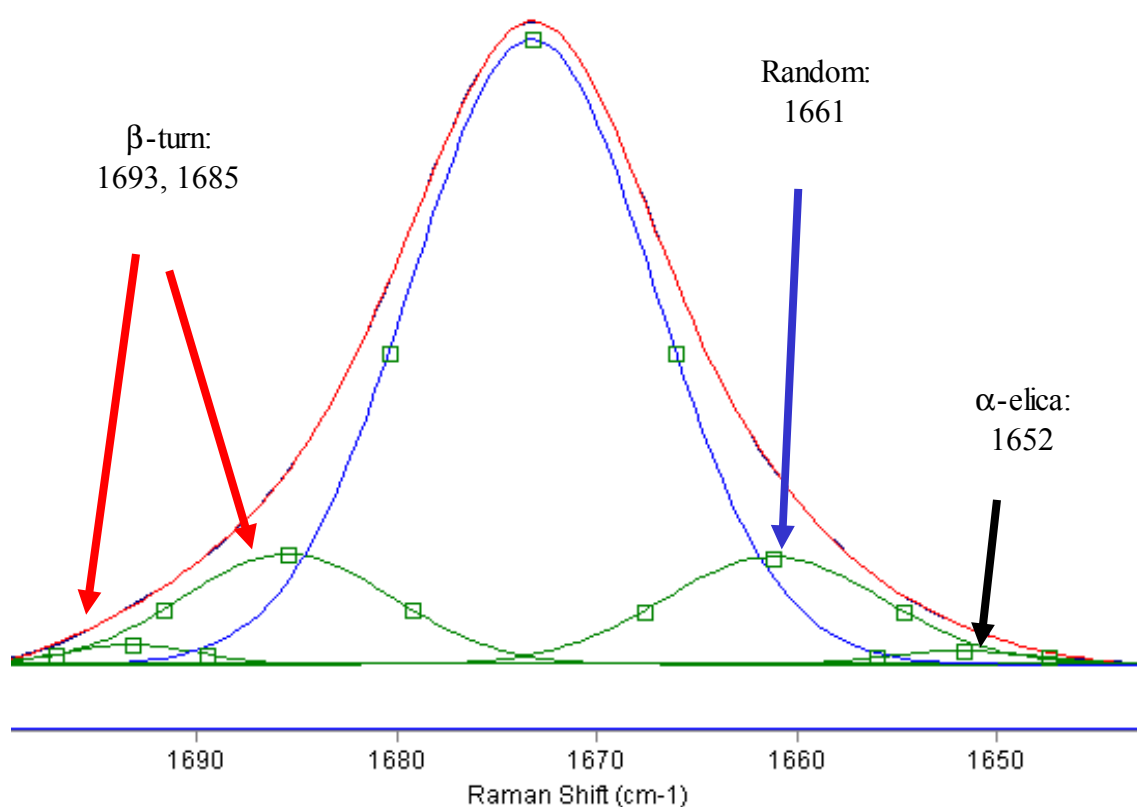


Figura 6: esempio di curve-fitting: dopo il calcolo della derivata seconda, si trovano le componenti della banda dell'amide I e si attribuiscono alle diverse strutture secondarie. La percentuale delle strutture è collegata all'area delle curve (la banda principale è relativa al β -sheet).

L'analisi sulla banda amide I degli spettri Raman è stata utilizzata per stimare la struttura secondaria dei peptidi solo dopo la sintesi, mentre non è stato possibile applicare il calcolo agli spettri dei liofilizzati a causa della bassa intensità del segnale dovuta alla minore concentrazione di peptide. La discussione di questi spettri è quindi solo di tipo qualitativo (gli spettri dei liofilizzati

mostrati in questo lavoro sono stati corretti con una linea di base nell'intervallo 1800-600 cm^{-1}). Anche gli spettri IR sono stati utilizzati solo per fini qualitativi, a causa dell'interferenza delle bande di assorbimento del vapore acqueo nella zona 1645-1640 cm^{-1} . Studi conformazionali dei peptidi in IR sono possibili solubilizzando le proteine in acqua pesante (che ha bande di assorbimento in altre regioni dello spettro) e controllando in maniera accurata lo scambio idrogeno-deuterio, oppure studiando il profilo della banda ammidica III (1300-1200 cm^{-1}), dove non l'acqua non assorbe. Purtroppo non è stato possibile utilizzare quest'ultima zona spettrale a causa della sovrapposizione con altre bande molto forti dei peptidi, dovute ad assorbimenti delle catene laterali.

Sono stati fatti alcuni tentativi di caratterizzazione dei peptidi anche con la calorimetria DSC, in particolare per individuare la temperatura di transizione vetrosa: purtroppo la quantità di campione a disposizione è risultata inferiore ai limiti di rilevanza della strumentazione disponibile.

C – RISULTATI E DISCUSSIONE

I – Peptidi appena sintetizzati

Nelle due figure seguenti, sono raccolti gli spettri IR e Raman di tutti gli otto peptidi appena sintetizzati, con la posizione delle principali bande discusse nel testo.

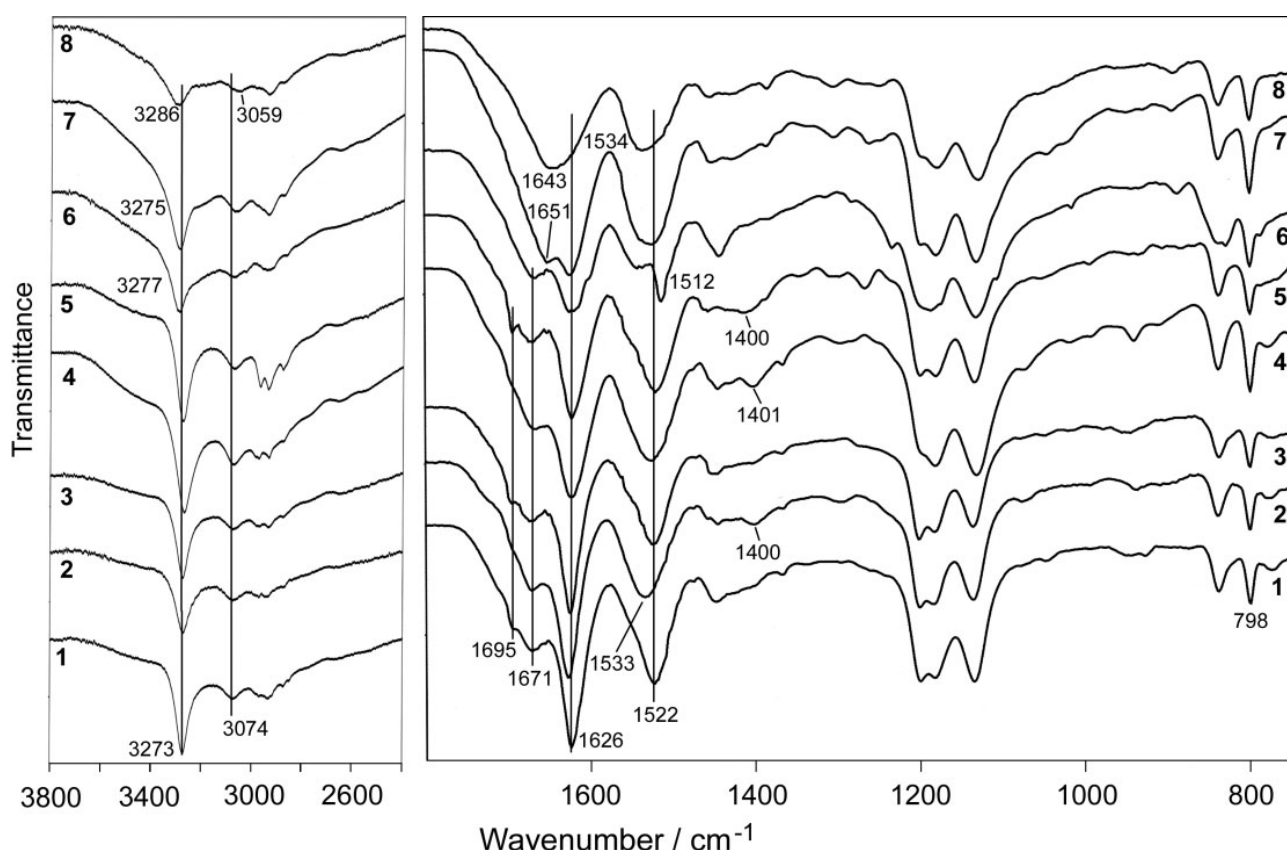


Figura 7: spettri IR degli otto peptidi dopo la sintesi.

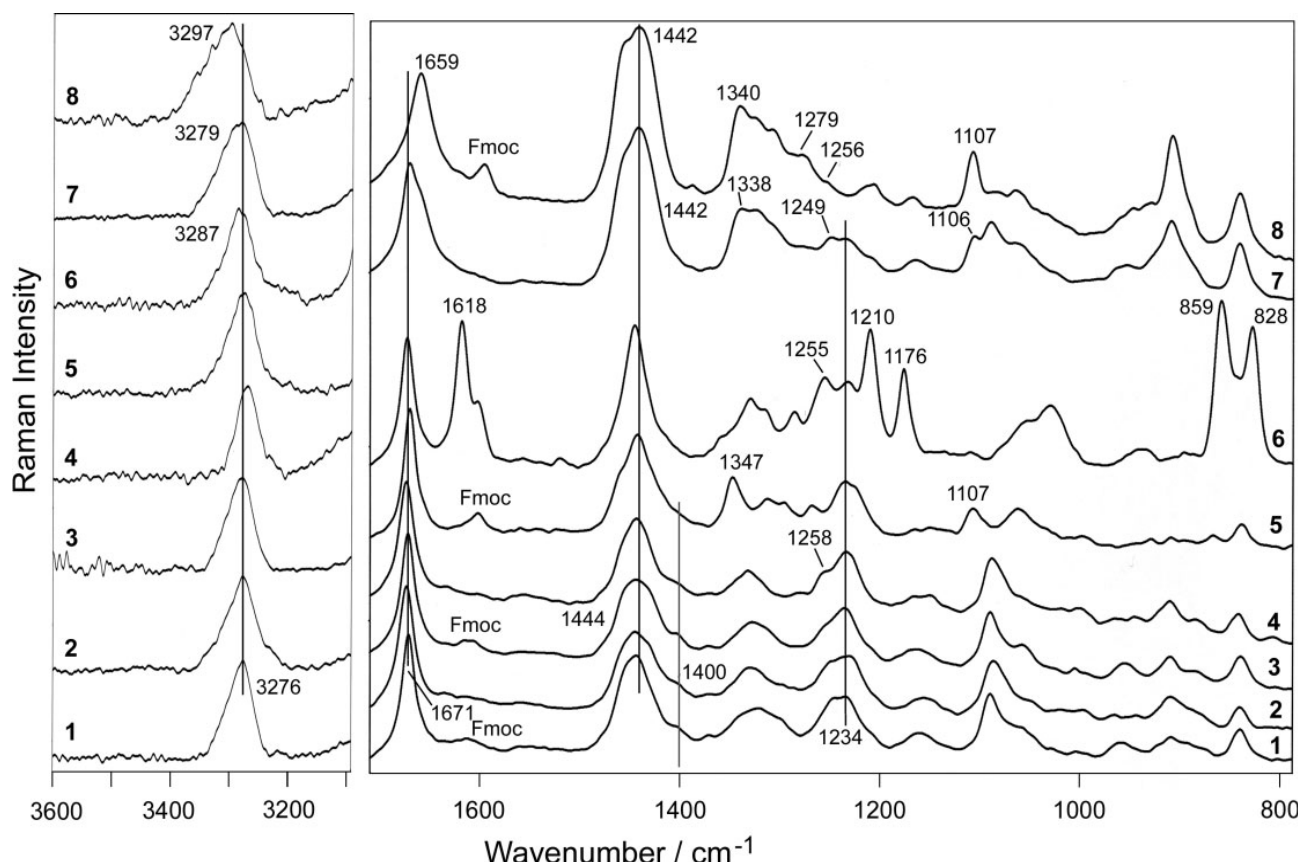


Figura 8: spettri Raman degli otto peptidi dopo la sintesi. La regione dello stretching NH è stata intensificata di un fattore 5.

PEPTIDE	IR				RAMAN
	νNH_3^+	ρNH_3^+	$\nu_{as} COO^-$	$\nu_s COO^-$	
1	3074	799	1556 sh	1401sh	1400 sh
2	3074	799	1557 sh	1400	1400 sh
3	3072	799	1556 sh	1400 sh	1400 sh
4	3070	798	1553 sh	1401	1402 sh
5	3072	798	1556 sh	1400	1400 sh
6	3074	798	TYR	1401 sh	1403 sh
7	3072	798	1556 sh	1398 sh	1403 sh
8	3059	798	1548 sh	1398 sh	1399 sh

Tabella 3: posizione delle bande dei gruppi carichi nei peptidi appena sintetizzati in spettroscopia IR e Raman: con sh sono indicate le bande considerate come spalla rispetto alla banda principale.

Per quanto riguarda la presenza di gruppi basici e acidi (tabella 3), gli spettri Raman e IR mostrano che i gruppi carbossilico COOH e amminico NH₂ sono presenti in forma carica. Infatti, dagli spettri

IR si possono osservare le bande nelle zone $3059\text{--}3074\text{ cm}^{-1}$ ($\nu\text{ NH}_3^+$) e a 800 cm^{-1} ($\rho\text{ NH}_3^+$). Inoltre, la derivata seconda degli spettri IR ha permesso di individuare le componenti vicino a 1555 cm^{-1} ($\nu_{\text{as}}\text{ COO}^-$) e 1400 cm^{-1} ($\nu_{\text{s}}\text{ COO}^-$). In particolare quest'ultima banda è stata osservata con maggiore precisione negli spettri dei peptidi 2, 4 e 5 e come spalla negli spettri Raman di tutti i peptidi.

Lo spettro Raman del peptide 6 mostra alcune bande di notevole intensità attribuibili ai residui di tirosina [15], in particolare a 1618 cm^{-1} (ν_{8a} , vibrazione dell'anello), 1255 cm^{-1} (ν_{7a} , vibrazione CO), 1210 cm^{-1} (ν_{7a} , C-CH₂), 1176 cm^{-1} (ν_{9a} , CH bending nel piano), 859 e 828 cm^{-1} (risonanza di Fermi tra la vibrazione dell'anello ν_1 e il secondo overtone ν_{16a} del piegamento dell'anello fuori dal piano) [16] e 646 cm^{-1} (ν_{6b} , deformazione dell'anello). Negli spettri Raman dei peptidi 1, 3, 5 e 8 compare una banda a circa 1615 cm^{-1} nella regione delle vibrazioni dei legami C-C aromatici. Questa banda può essere attribuita al gruppo Fmoc residuo usato nella sintesi. Proprio la spettroscopia Raman è stata usata con successo per monitorare la sintesi in fase solida dei peptidi e in particolare per seguire l'efficienza della reazione di deprotezione. [17]

Per quanto riguarda gli spettri IR, i peptidi 1-6 mostrano, come componente principale della banda amide I, una banda a circa 1625 cm^{-1} , dovuta alla struttura β -sheet [18] e una componente a circa 1695 cm^{-1} attribuibile al β -sheet antiparallelo [18] e particolarmente visibile nei peptidi 1, 3 e 5. Nella regione tra 1665 e 1673 cm^{-1} compare un'altra componente, ascrivibile ad una sovrapposizione di bande deboli dovuta a strutture β (intorno a 1675 cm^{-1}), α -elica, β -turn e strutture disordinate.

Il modo di vibrazione amide II compare intorno a 1520 cm^{-1} , tipico delle strutture β -sheet [18], nei peptidi 1 e 3-5. Nel peptide 2, questa banda è spostata a 1533 cm^{-1} , a causa della posizione del modo $\nu_{\text{as}}\text{ COO}^-$ dell'acido aspartico, che assorbe a numeri d'onda superiori rispetto all'acido glutammico [21]. Nel peptide 6, l'intensa vibrazione dell'anello della tirosina a 1512 cm^{-1} si sovrappone alla banda amide II.

I risultati IR indicano che tutti i peptidi 1-6 hanno una prevalente struttura β -sheet, come ulteriormente confermato dagli spettri Raman nei quali questi peptidi mostrano le bande amide I e amide III nelle regioni tipiche del β -sheet antiparallelo ($1670\text{--}1673\text{ cm}^{-1}$ e $1231\text{--}1236\text{ cm}^{-1}$ rispettivamente) [22], con presenza di piccole quantità di β -turn e strutture disordinate.

Per quanto riguarda il peptide 8, le bande amide I e II si trovano a 1643 e 1534 cm^{-1} , e indicano un prevalente carattere di α -elica [18]. Riguardo al peptide 7, le principali componenti di amide I e amide II si osservano a 1626 e 1525 cm^{-1} , indicando una struttura prevalente β -sheet; tuttavia, la componente a numeri d'onda maggiori cade a 1651 cm^{-1} , cioè a valori compatibili con le strutture ad α -elica [18].

Nella regione amide III dello spettro Raman, i peptidi 1-4 e 6 mostrano un'ulteriore componente nell'intervallo $1245\text{--}1258\text{ cm}^{-1}$, assegnabile a strutture di tipo disordinato/ β -turn [22], in aggiunta alla componente relativa al β -sheet, suggerendo la presenza di entrambi i tipi di strutture. Nel peptide 5 è interessante osservare che la posizione dell'amide I è minore rispetto ai peptidi

precedentemente citati (1670 cm^{-1}); inoltre le bande a 1347 e 1107 cm^{-1} ($\delta\text{ CC}_\alpha\text{H}$ e $\nu\text{ CN}$) sono diagnostiche della presenza di strutture ad α -elica. [22-24]. Il peptide 8 mostra le bande ammidiche I e ammidiche III a 1659 e 1279 cm^{-1} , numeri d'onda tipici dell' α -elica; [22] la prevalente struttura ad α -elica è confermata anche dalla presenza delle bande a 1340 e 1107 cm^{-1} . La componente ammidica III a 1256 cm^{-1} suggerisce anche la presenza di una certa quantità di strutture in conformazione disordinata/ β -turn.

Per quanto riguarda il peptide 7, la componente principale dell'ammidica I a 1670 cm^{-1} mostra una spalla a numeri d'onda inferiori (α -elica e/o strutture disordinate) in accordo con la componente a 1249 cm^{-1} nella regione ammidica III: questi dati suggeriscono la presenza di strutture disordinate.

Del resto, le componenti a 1338 e 1106 cm^{-1} rivelano la presenza di α -elica.

I risultati qualitativi sulla struttura secondaria sono stati confermati da un punto di vista quantitativo dall'analisi delle bande Raman dell'ammidica I usando il metodo di Alix [14] e il curve-fitting.

PEPTIDE	ALIX				FIT RAMAN			
	β -sheet	β -turn	random	α -helix	β -sheet	β -turn	random	α -helix
1	67	17	10	6	67	15	14	4
2	72	17	11	0	72	15	11	2
3	70	17	10	3	69	14	11	6
4	74	14	12	0	76	11	10	3
5	64	16	10	10	66	15	11	8
6	71	17	10	2	69	17	10	4
7	54	18	10	16	48	12	25	15
8	25	13	9	53	23	14	14	49

Tabella 4: analisi quantitativa della struttura secondaria degli otto peptidi analizzati con il metodo di Alix (errore associato: 4% per il β -turn, 2% per strutture disordinate, 5% per β -sheet e 8 % per α -elica) e con il curve-fitting ($R_2 > 0.999$ e $\text{RMS} = 0.00001$; errore associato 2-4%) della banda ammidica I.

La tabella mostra le percentuali di strutture secondarie ottenute con i due metodi. I dati confermano che i peptidi 1-6 hanno una struttura prevalente β -sheet (64-74%), in accordo con altri dati riportati per EAK-16 [7-12], con circa il 15% di β -turn, 10% di strutture disordinate e piccoli contributi di α -elica. Tra questi peptidi, il peptide 5 mostra il più elevato contenuto di α -elica (circa il 10%). I peptidi che contengono la sequenza RGD (7 e 8) hanno una composizione differente; il peptide 7 ha

una prevalente struttura β -sheet (circa il 50%) con una discreta quantità di α -elica, mentre il peptide 8, a causa della sua sequenza modificata, ha una prevalente struttura ad α -elica (circa 50%).

Un'altra interessante caratteristica degli spettri Raman è la larghezza a metà altezza (FWHM) della banda δ CH₂ (1442-1445 cm⁻¹), che può essere un indice dell'ordine relativo della componente idrofobica, come suggerito per gli aggregati fosfolipidici [25]. Questo valore varia da 28 cm⁻¹ per il peptide 6 a 48 cm⁻¹ per il peptide 8, che quindi appare essere il peptide più disordinato. Questo risultato può essere messo in relazione con la posizione del modo ν NH (tabella 5). I peptidi 1-5 mostrano il loro picco attorno a 3270 cm⁻¹ sia negli spettri Raman, sia in quelli IR, indicando la presenza di legami ad idrogeno di media forza. Nei peptidi 7 e 8, questa banda cade a numeri d'onda maggiori (nell'IR a 3275 e 3286 cm⁻¹ e in Raman a 3279 e 3297 cm⁻¹), indicando la formazione di legami ad idrogeno più deboli. Questi dati sono in accordo con i dati strutturali: infatti il modo ν NH in IR appare a numeri d'onda più alti per l' α -elica rispetto al β -sheet [16]. Il peptide 8 è caratterizzato dalla larghezza maggiore della banda corrispondente, rafforzando l'idea che abbia una struttura meno ordinata.

Il peptide 6 mostra la minore FWHM (tabella 6) del δ CH₂: questo risultato può essere spiegato considerando la presenza dei gruppi aromatici della tirosina che fanno aumentare le interazioni e la stabilità del peptide attraverso interazioni π - π [26]. Allo stesso tempo, si può osservare che il modo ν NH compare a valori superiori rispetto agli altri peptidi con struttura β -sheet (3277 cm⁻¹ in IR e 3287 cm⁻¹ in Raman), suggerendo che il gruppo aromatico costituisca un ingombro sterico per la formazione di legami ad idrogeno più forti.

PEPTIDE	BANDA RAMAN (cm ⁻¹)	BANDA IR (cm ⁻¹)
1	3276	3273
2	3277	3271
3	3276	3274
4	3268	3269
5	3275	3273
6	3287	3277, 3285
7	3279	3275
8	3297	3286

Tabella 5: posizione delle bande dello stretching NH nei peptidi dopo la sintesi.

PEPTIDE	BANDA RAMAN (cm ⁻¹)	FWHM (cm ⁻¹)
1	1444	41
2	1445	44
3	1444	45
4	1443	38
5	1443	41
6	1445	28
7	1442	45
8	1442	48

Tabella 6: posizione e larghezza a metà altezza delle bande del bending CH₂ nei peptidi dopo la sintesi.

Per quanto riguarda il peptide 6, le due bande Raman della tirosina a 859 e 828 cm⁻¹ possono essere usate per investigare lo stato dei legami ad idrogeno che riguardano il gruppo fenolico. Il rapporto di intensità tra le due componenti è stato usato come indicatore delle interazioni della tirosina nelle proteine globulari, in particolare nella formazione di aggregati e nel grado di esposizione al solvente [22]. Infatti, se la tirosina è nascosta, il gruppo OH agisce come forte donatore di legami ad idrogeno verso gruppi accettori più elettronegativi (come l'ossigeno dei gruppi carbossilici), e il rapporto di intensità raggiunge un valore minimo di 0.3 [16]. Quando la tirosina è sulla superficie della proteina in soluzione acquosa (esposta), il gruppo OH agisce sia come donatore, sia come accettore di legami ad idrogeno di media o scarsa forza e il rapporto di intensità è di circa 1.25 [16]. Quando l'ossigeno del gruppo fenolico è accettore di legami ad idrogeno forti (ad esempio da un gruppo NH₃⁺ di una lisina) e non agisce come donatore, il rapporto di intensità raggiunge un valore massimo di 2.5. Valori elevati (>1.25) sono stati osservati in virus filamentosi [27] e nella fibroina forma silk I della seta [28] per i quali questi valori sono stati interpretati come indicativi della presenza di un ambiente molto idrofobo intorno alla tirosina. Il rapporto I₈₅₉/I₈₂₈ per il peptide 6 è di 1.18, indicando che la tirosina è esposta ed agisce sia da donatore, sia da accettore di legami ad idrogeno. Il rapporto calcolato dallo spettro è un valore medio, poiché è la media degli stati di tutte le tirosine presenti nel peptide. Tuttavia, questo risultato può essere compreso osservando che gli amminoacidi presenti nel peptide 6 possono essere coinvolti in legami ad idrogeno con la lisina e l'acido glutammico; quest'ultimo può essere solo accettore di protoni, mentre l'altro può essere solo donatore. Lo stato del legame ad idrogeno del gruppo fenolico è confermato dalla posizione delle bande ν_{7a} e $\nu_{7a'}$; in accordo con Takeuchi [29], la presenza di questi modi a 1255 e 1210 cm⁻¹ rispettivamente, suggerisce la formazione di legami ad idrogeno deboli.

II- Peptidi dopo solubilizzazione e liofilizzazione

Le figure 9 e 10 mostrano gli spettri Raman e IR dei peptidi dopo solubilizzazione e liofilizzazione.

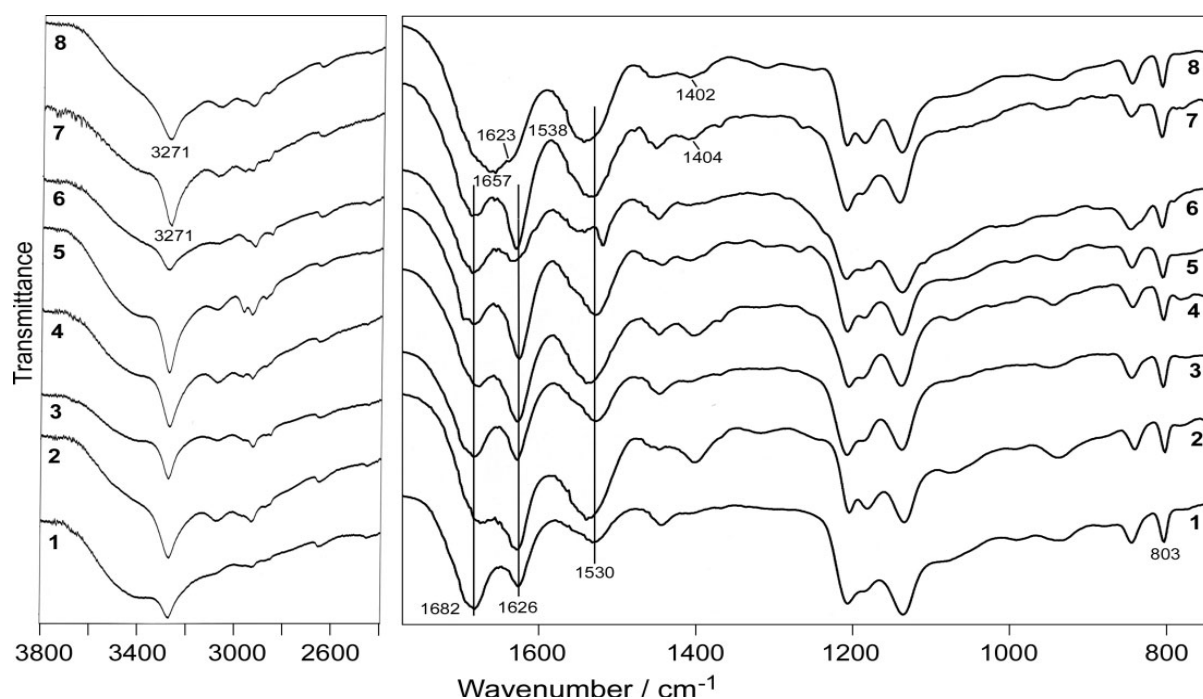


Figura 9: spettri IR degli otto peptidi dopo il trattamento di solubilizzazione e liofilizzazione.

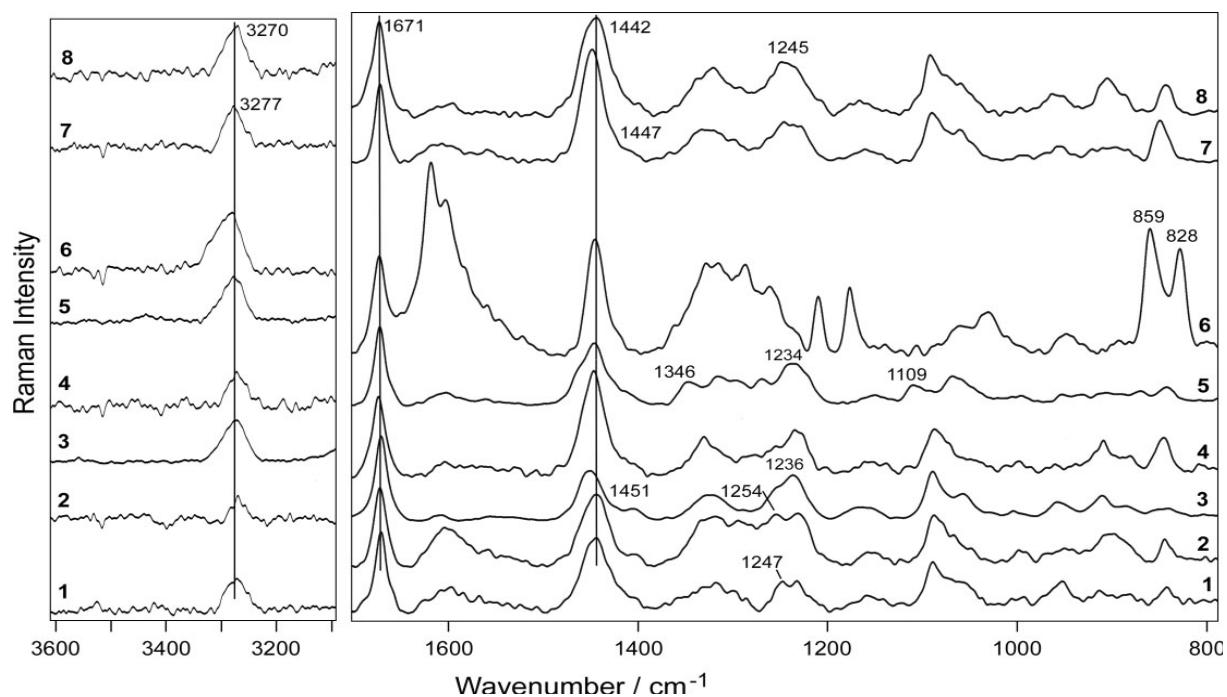


Figura 10: spettri Raman degli otto peptidi dopo il trattamento di solubilizzazione e liofilizzazione. La regione dello stretching NH è stata intensificata di un fattore 5.

Per quanto riguarda la presenza di gruppi acidi e basici, gli spettri IR dimostrano che i gruppi COOH e NH₂ rimangono nella loro forma carica (tabella 7). Dopo solubilizzazione e liofilizzazione, è stato osservato un generale aumento della $\nu_{as} COO^-$ (di 8-10 cm⁻¹), $\nu_s COO^-$ (di 3-5 cm⁻¹) e ρNH_3^+ (di 2-4 cm⁻¹). Questi cambiamenti possono riflettere la presenza di legami ad idrogeno e interazioni ioniche diverse. In particolare, può essere osservato che nei peptidi analizzati, la differenza ($\Delta\nu$) tra i valori di $\nu_{as} COO^-$ e $\nu_s COO^-$ è variata dopo il trattamento. Bisogna ricordare che in caso di legame ad idrogeno asimmetrico che coinvolge gli ossigeni del gruppo carbossilico, un CO ha più carattere di legame singolo, mentre l'altro più di legame doppio. Ciò tende a fare aumentare la differenza $\Delta\nu$ in misura maggiore rispetto al caso di due legami CO equivalenti [30]. Lo stesso si verifica quando un metallo si lega in maniera più forte ad uno dei due ossigeni del gruppo carbossilico [31].

PEPTIDE	IR				RAMAN
	νNH_3^+	ρNH_3^+	$\nu_{as} COO^-$	$\nu_s COO^-$	$\nu_s COO^-$
1	3068 sh	803	1555 sh	1407	1399 sh
2	3070	801	1555 sh	1403	1407
3	3072	801	1556 sh	1402	1404
4	3076	801	1555 sh	1403	1405
5	3076	801	1556 sh	1403	1404 sh
6	3070	802	TYR	1403	1403 sh
7	3080	801	1557 sh	1406	1405 sh
8	3069	801	1556 sh	1403	1398

Tabella 7: posizione delle bande dei gruppi carichi nei peptidi dopo solubilizzazione e liofilizzazione in spettroscopia IR e Raman: con sh sono indicate le bande considerate come spalla rispetto alla banda principale.

Gli spettri Raman dei peptidi 1-6 non mostrano cambiamenti nella posizione e nella larghezza dell'ammide I, suggerendo che la struttura prevalente debba essere β -sheet. Tuttavia, un'analisi più approfondita dei dati spettrali, rivela che sono avvenuti alcuni cambiamenti. Gli spettri Raman dei peptidi 1 e 2 mostrano una banda ammidica III attribuibile alle strutture disordinate a 1247 e 1254 cm⁻¹, mentre dopo la sintesi queste bande apparivano solo come spalle. I cambiamenti nella regione ammidica I e II degli spettri IR sono in accordo con questi dati: l'ammide II si sposta verso numeri d'onda maggiori, suggerendo un maggior grado di disordine. Inoltre, in entrambi i peptidi, la componente a numeri d'onda più alti (a 1682 cm⁻¹ nel peptide 1) è aumentata di intensità rispetto alla componente β -sheet a 1625 cm⁻¹. I peptidi 3-6 mostrano un comportamento analogo; nei peptidi 3 e 5 l'ammide II è rimasta a circa 1525 cm⁻¹ e la componente Raman principale dell'ammide III compare a 1235 cm⁻¹. La posizione della banda νNH non è cambiata negli spettri IR dei peptidi 1-6.

Per quanto riguarda il peptide 6, il rapporto di intensità delle bande Raman I_{859}/I_{828} non è variato, indicando che l'intorno della tirosina non è variato con il trattamento aggregante.

Tutti questi dati suggeriscono che i peptidi 1-6 hanno subito una diminuzione dell'ordine conformazionale, sebbene la struttura prevalente resti il β -sheet. Lo spettro del peptide 5 mostra ancora le bande tipiche della struttura alfa a 1346 e 1109 cm^{-1} . Da questo punto di vista, il comportamento degli altri peptidi contenenti questa conformazione (7 e 8) è diverso, poiché queste bande marker dell' α -elica non si osservano. Per entrambi i peptidi, la banda Raman ammidica I ha diminuito la sua larghezza, mentre la sua posizione è rimasta immutata in peptide 7, mentre è variata da 1659 a 1670 cm^{-1} in peptide 8. Questi due peptidi mostrano anche una diminuzione del numero d'onda del ν NH (nella zona 3277-3270 cm^{-1}) indicando la formazione di legami ad idrogeno compatibili con la struttura β . Contemporaneamente, il contenuto di α -elica dei due peptidi è divenuto trascurabile.

Nella regione ammidica III, i peptidi 7 e 8 mostrano una banda molto larga a circa 1245 cm^{-1} che può essere interpretata in relazione al comportamento della banda a più alti numeri d'onda dell'ammidica I nello spettro IR. In peptide 7 si è spostata da 1651 a 1681 cm^{-1} , come osservato per gli altri peptidi. In peptide 8, la componente principale dell'ammidica I appare a 1657 cm^{-1} , con una spalla a 1623 cm^{-1} indicante la presenza della componente β -sheet.

PEPTIDE	BANDA RAMAN (cm^{-1})	FWHM (cm^{-1})	Δ %
1	1444	35	-15
2	1444	36	-18
3	1451	30	-33
4	1446	30	-21
5	1446	35	-15
6	1445	23	-18
7	1447	28	-38
8	1442	37	-19

Tabella 8: posizione, larghezza (con indicata la variazione rispetto al peptide prima del trattamento di solubilizzazione e liofilizzazione) a metà altezza delle bande del bending CH_2 .

Il trattamento di solubilizzazione ha anche influito sulle interazioni idrofobiche tra i gruppi alchilici: tutti i peptidi mostrano una diminuzione di circa il 20% della larghezza della banda δ CH_2 degli spettri Raman. Per i peptidi 3 e 7 questa banda si è spostata di circa 6 cm^{-1} e mostra le diminuzioni

di larghezza più consistenti. Questi risultati si collegano ad un aumento dell'ordine delle catene alifatiche presenti nelle strutture dei peptidi (tabella 8). La presenza di una certa quantità di strutture β -sheet nel peptide 8 può essere sorprendente a causa della sua struttura primaria irregolare. Tuttavia si può osservare che esiste comunque una certa complementarità tra le catene laterali, che può consentire le interazioni ioniche intra e inter molecolari, sebbene in maniera inferiore rispetto alle interazioni idealmente infinite dell'EAK-16 (figura 11) [7].

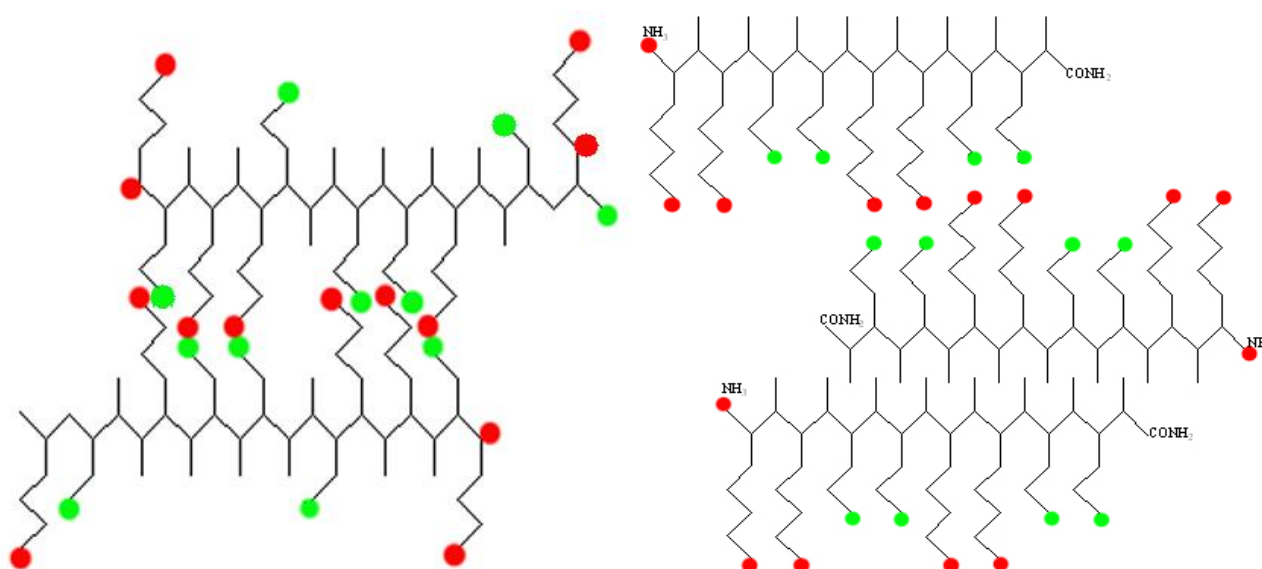


Figura 11: le interazioni intermolecolari in peptide 8 (a sinistra) e in peptide 1 (a destra). \bullet : gruppi positivi (NH_3^+), \bullet : gruppi negativi (COO^-).

III - Peptidi depositati su titanio ossidato

L'esame al microscopio ottico (figura 12) dei peptidi depositati sulle superfici di titanio poroso ossidato ha mostrato che non tutti i peptidi sono in grado di formare una struttura auto-assemblata ordinata e omogenea sulla superficie metallica.

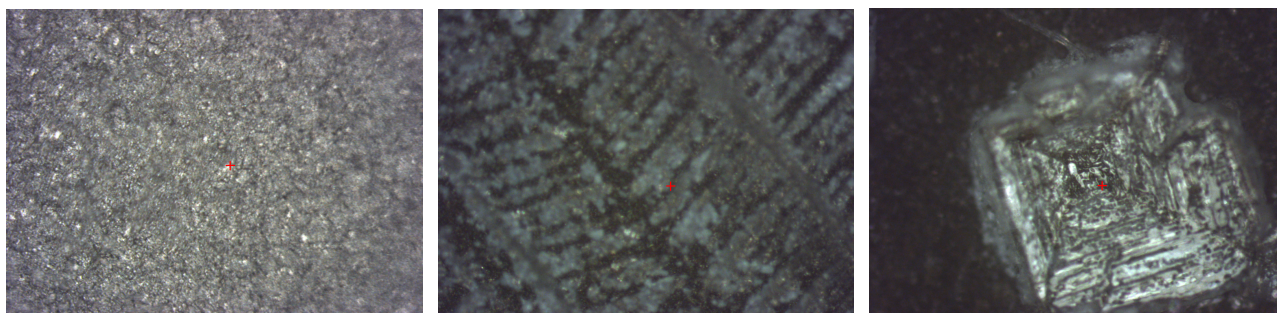


Figura 12: immagini al microscopio ottico della superficie di titanio poroso ossidato (a sinistra), della struttura regolare formata dei peptidi 1, 5, 6 e 7 (al centro) e della struttura cristallina dei peptidi 2, 3, 4 e 8 (a destra).

Infatti solo i peptidi 1, 5, 6 e 7 riescono a formare uno strato piuttosto omogeneo, mentre i peptidi 2, 3 e 4 formano dei cristalli piuttosto grandi, ma separati tra loro e disposti in modo disomogeneo sulla superficie. Il peptide 8, invece, mostra una situazione più complessa in quanto sono presenti sia zone omogenee, che cristalli e aggregati di tipo amorfo.

A queste differenze di tipo morfologico corrispondono profonde differenze negli spettri ottenuti con la microscopia IR. Infatti, gli spettri dei peptidi che formano uno strato omogeneo mostrano le tipiche bande della struttura β -sheet: $3275\text{-}3270\text{ cm}^{-1}$ nella zona dello stretching NH e 1621 cm^{-1} nella regione ammidica I. Dagli spettri appare importante anche il contributo del β -turn come rivelato dall'intensità della banda a 1685 cm^{-1} nell'ammidica I: questa banda però appare più debole rispetto a quanto osservato dopo il trattamento aggregante e quindi suggerisce che i peptidi si dispongano in maniera più ordinata sulla superficie del metallo. Altre caratteristiche interessanti osservate in questi spettri sono l'aumento di intensità della banda ammidica II (da alcuni autori considerata come indice di adsorbimento sulla superficie metallica [32]) e dalla banda $\nu_s\text{ COO}^-$ a 1400 cm^{-1} : quest'ultima banda, osservata solo come spalla in molti dei peptidi dopo il trattamento aggregante, potrebbe indicare che il gruppo carbossilico sia il mediatore delle interazioni tra superficie ossidata (e in particolare con i gruppi OH) e il peptide [11, 33].

I peptidi che non presentano struttura omogenea hanno uno spettro IR caratterizzato dallo spostamento della banda $\nu\text{ NH}$ verso numeri d'onda maggiori (quindi i legami ad idrogeno sono mediamente più deboli), mentre la banda ammidica I appare molto larga e spostata nella zona α -elica/strutture disordinate ($1670\text{-}1650\text{ cm}^{-1}$). Anche in questi casi si osservano l'aumento di intensità della banda ammidica II (adsorbimento) e la comparsa della $\nu_s\text{ COO}^-$.

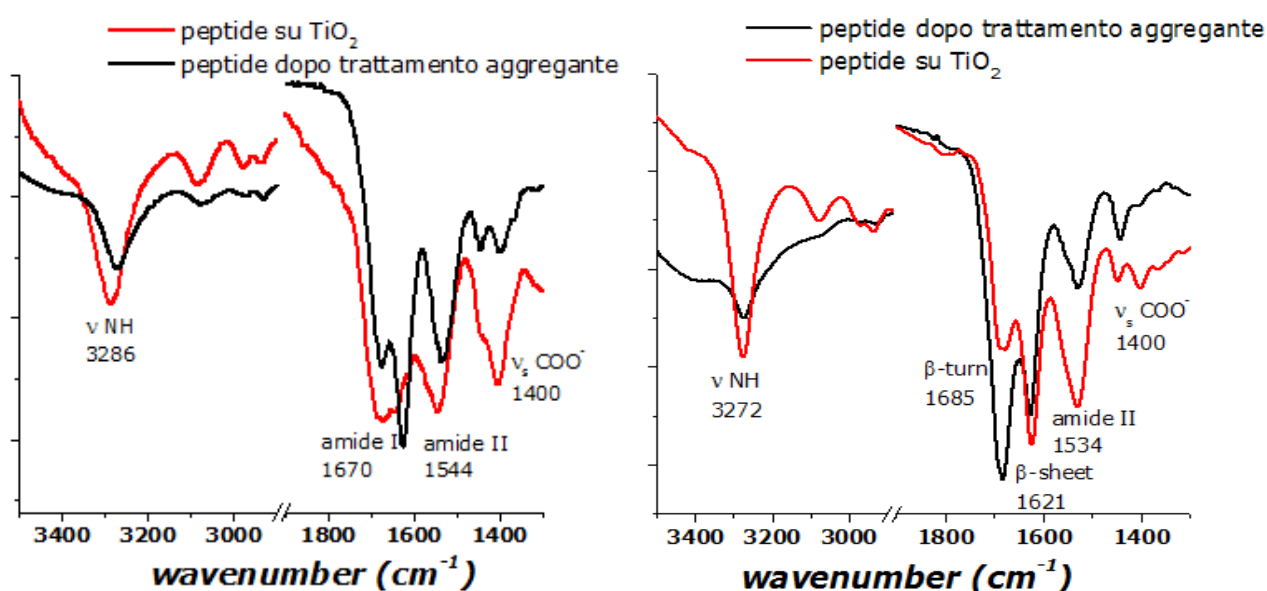


Figura 13: a sinistra, spettro micro-IR del peptide 3 (non forma strutture ordinate), a destra, spettro micro-IR del peptide 1 (forma strutture ordinate)

Da queste misure preliminari (si ha in programma di completare l'analisi spettroscopica dei peptidi depositati con la spettroscopia micro-Raman), i peptidi adatti ad essere impiegati per la funzionalizzazione delle superfici di titanio sono: 1, 5, 6 e 7.

D - CONCLUSIONI

L'analisi spettrale dei peptidi dopo la sintesi mostra che la sostituzione dell'amminoacido acido (peptide 2), di quello basico (peptide 3) o di entrambi (peptide 4) non induce variazioni significative nella conformazione rispetto al peptide 1. Tutti questi peptidi hanno una struttura prevalente di tipo β -sheet (64-74 %), con circa 15% di β -turn, 10% di strutture disordinate e poca α -elica. La sostituzione degli amminoacidi non polari ha avuto un'influenza maggiore: il peptide 5 mostra un maggior contenuto di α -elica, mentre nel peptide 6, la presenza della tirosina ha creato un maggior ordine nelle catene idrofobiche e ha stabilizzato la struttura del peptide tramite interazioni π - π .

L'inserimento della sequenza RGD all'estremità N-terminale del peptide ha avuto effetti ancora maggiori: nel peptide 7 il contenuto di β -sheet è diminuito a circa il 50% ed è aumentato il contenuto di α -elica (15%). La contemporanea rottura della regolarità della sequenza in peptide 8 ha fatto variare la struttura in maniera radicale, ottenendo un peptide con struttura prevalentemente α -elica.

Il trattamento di solubilizzazione e liofilizzazione ha fatto aumentare il contenuto di strutture disordinate, sebbene si sia osservato un maggiore ordine della componente alifatica; la struttura prevalente è rimasta di tipo β -sheet. Strutture α -elica possono essere rilevate solo nel peptide 5 dopo il trattamento: il peptide 7 ha incrementato il suo contenuto di β -sheet, mentre il peptide 8 mostra una prevalente struttura disordinata con un basso contenuto di β -sheet.

Sulla superficie di titanio ossidato rugoso solo alcuni dei peptidi adottano una struttura autoassemblata: questi peptidi (1, 5, 6 e 7) mostrano le bande caratteristiche della struttura β -sheet, un aumento di intensità dell'ammide II (marker dell'adsorbimento) e la comparsa della banda ν_{COO^-} che probabilmente interagisce con la superficie ossidata del metallo: questi peptidi sembrano adatti all'uso per la funzionalizzazione delle superfici di impianti metallici.

Bibliografia

- [1] Bernhardt R, van den Dolder J, Bierbaum S, Beutner R, Scharnweber D, Jansen J, Beckmann F, Worch H. Osteoconductive modifications of Ti-implants in a goat defect model: characterization of bone growth with SR μ CT and histology. *Biomaterials* 2005; 26: 3009.
- [2] Biltresse S, Attolini M, Marchand-Brynaert J. Cell adhesive PET membranes by surface grafting of RGD peptidomimetics. *Biomaterials* 2005; 26: 4576.
- [3] Hersel U, Dahmen C, Kessler H. RGD modified polymers: biomaterials for stimulated cell adhesion and beyond. *Biomaterials* 2003; 24: 4385.
- [4] Schaffner P, Dard M M. Structure and function of RGD peptides involved in bone biology.

CMLS 2003; 60: 119.

- [5] Schuler M, Owen G R, Hamilton D W, de Wild M, Textor M, Brunette D M, Tosatti S G P. Biomimetic modification of titanium dental implant model surfaces using the RGDSP-peptide sequence: a cell morphology study. *Biomaterials* 2006; 27: 4003.
- [6] Xiao S J, Textor M, Spencer N D. Covalent Attachment of Cell-Adhesive, (Arg-Gly-Asp)-Containing Peptides to Titanium Surfaces. *Langmuir* 1998; 14: 5507.
- [7] Zhang S, Holmes T, Lockshin C, Rich A. Spontaneous assembly of a self-complementary oligopeptide to form a stable macroscopic membrane. *PNAS* 1993; 90: 3334.
- [8] Zhang S, Holmes T, Di Persio C M, Hynes R O, Su X, Rich A. Self-complementary oligopeptide matrices support mammalian cell attachment. *Biomaterials* 1995; 16: 1385.
- [9] Zhang S. Emerging biological materials through molecular self-assembly. *Biotechnology advances* 2002; 20: 321.
- [10] Holmes T C. Novel peptide-based biomaterial scaffolds for tissue engineering. *Trends in Biotechnology* 2002; 20: 16.
- [11] Polzonetti G, Battocchio C, Iucci G, Dettin M, Gambaretto R, Di Bello C, Carravetta V. Thin films of a self-assembling peptide on TiO₂ and Au studied by NEXAFS, XPS and IR spectroscopies. *Materials Science & Engineering C* 2006; 26, 929.
- [12] Jun S, Hong Y, Imamura H, Ha B Y, Bechhoefer J, Chen P. Self-assembly of the ionic peptide EAK-16: the effect of charge distributions on self-assembly. *Biophysical Journal* 2004; 87: 1249.
- [13] Stehle M A, Rosch P, Petry R, Hauck A, Thull R, Kiefer W, Popp J. A Raman spectroscopic study of the adsorption of fibronectin and fibrogen on titanium dioxide nanoparticles. *Physical Chemistry Chemical Physics* 2004; 6: 5232.
- [14] Alix A J P, Pedanou G, Berjot M. Fast determination of the quantitative secondary structure of proteins by using some parameters of the Raman amide I band. *Journal of Molecular Structure* 1988; 174: 159.
- [15] Harada I, Tacheuki H. *Spectroscopy of Biological Systems* 13: 113. Clark R H J, Hester R E (ed) John Wiley: Chichester 1986.
- [16] Siamwiza M N, Lord R C, Chen M C, Takamatsu T, Harada I, Matsuura H, Shimanouchi T. Interpretation of the doublet at 850 and 830 cm⁻¹ in the Raman spectra of the tyrosyl residues in proteins and certain model compounds. *Biochemistry* 1975; 14: 4870.
- [17] Due Larsen B, Christensen D H, Holm A, Zillmer R, Faurskov Nielsen O. The Merryfield peptide synthesis studied by near-infrared Fourier-transform Raman spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society* 1993; 115: 6247.
- [18] Parker F S. Proteins and polypeptides. *Applications of Infrared Spectroscopy in Biochemistry, Biology and Medicine*. Plenum press: New York 1971.
- [19] Byler DM, Susi H. Examination of the secondary structure of proteins by deconvolved FTIR spectra. *Biopolymers* 1986; 25: 469
- [20] Torii H, Tasumi M. Model calculations on the amide-I infrared bands of globular proteins.

Journal of Chemical Physics 1992; 96: 3379.

[21] Rahmelow K, Hubner W, Ackermann T. Infrared absorbances of protein side chains. *Analytical Biochemistry* 1998; 257: 1.

[22] Tu A T. *Raman Spectroscopy in Biology: Principles and Applications*. John Wiley: New York 1984.

[23] Tuma R. Raman spectroscopy of proteins: from peptides to large assemblies. *Journal of Raman Spectroscopy* 2005; 36: 307.

[24] Frushour B G, Koenig J L. Raman spectroscopic study of mechanically deformed poly L-alanine. *Biopolymers* 1974; 13: 455.

[25] Lewin I W. *Advances in Infrared and Raman Spectroscopy* 11. Clark R J H, Hester R E (ed). John Wiley: New York 1984.

[26] Dutt A, Drew M G B, Pramanik A. β -sheet mediated self-assembly of dipeptides of ω -aminoacids and remarkable fibrillation in the solid state. *Organic and Biomolecular Chemistry* 2005; 3: 2250.

[27] Arp Z, Autrey D, Laane J, Overman S A, Thomas G J. Tyrosine Raman signatures of the filamentous virus Ff are diagnostic of non-hydrogen bonded phenoxyls: demonstration by Raman infrared spectroscopy of p-cresol vapor. *Biochemistry* 2001; 40: 2522.

[28] Taddei P, Asakura T, Yao J, Monti P. Raman study of poly(alanil-glycine)-based peptides containing tyrosine, valine and serine as model for the semicrystalline domain of Bombyx mori silk fibroin. *Biopolymers* 2004; 75: 314.

[29] Takeuchi H, Watanabe Y, Satoh Y, Harada I. Effects of hydrogen bonding on the tyrosine Raman bands in the 1330-1150 cm^{-1} region. *Journal of Raman Spectroscopy* 1989; 20: 233.

[30] Colthup N B, Daly L H, Wiberley S E. *Introduction to Infrared and Raman Spectroscopy*. Academic press: New York 1990.

[31] Deacon G B, Philips R J. Relationships between the carbon-oxygen stretching frequencies of carboxylato complexes and the type of carboxylate coordination. *Coordination Chemistry Reviews* 1980; 33: 227.

[32] Giacomelli C E, Bremer M G E, Norde W. ATR-FTIR study of IgG adsorbed on different silica surfaces. *Journal of Colloid and Interface Science* 1999; 220: 13-23.

[33] Roddick-Lanzillotta A D, McQuillan A J. An *in situ* infrared spectroscopic study of glutamic acid and aspartic acid adsorbed on TiO_2 : implications for the biocompatibility of titanium. *Journal of Colloid and Interface Science* 2000; 227: 48.

CONCLUSIONI

Il presente lavoro di tesi ha indagato alcuni dei principali problemi collegati all'applicazione della Tissue Engineering in campo protesico, legati soprattutto alla caratterizzazione dei materiali utilizzati come supporto e alle strategie biomimetiche impiegate per favorire l'integrazione dell'impianto.

In particolare è stato sottolineato come le tecniche utilizzate per questo studio (tecniche vibrazionali e termiche) siano in grado di caratterizzare in maniera adeguata le proprietà chimico-fisiche dei materiali:

- cristallinità;
- composizione relativa nel caso di materiali compositi;
- struttura e conformazione delle catene polimeriche e peptidiche;
- meccanismo e velocità di degradazione;
- interazioni intra e intermolecolari (legami ad idrogeno, interazioni tra catene alifatiche).

Questo tipo di informazioni sono di grande importanza nella comprensione delle interazioni che il materiale subisce a contatto con i tessuti ospiti, fondamentali per prevedere i meccanismi di biodegradazione durante i quali le caratteristiche chimico-fisiche dei materiali possono subire notevoli variazioni. Per una caratterizzazione completa dei materiali, queste informazioni devono necessariamente essere integrate dalle informazioni relative al comportamento meccanico e *in vivo*, grazie alle collaborazioni attivate con le cliniche ortopediche e i dipartimenti di ingegneria biomedica.

Questo studio si è focalizzato su tre diversi sistemi compositi che corrispondono ad altrettante strategie della Tissue Engineering: replica della struttura fibrosa tridimensionale della matrice extracellulare (PCL-PLLA), incorporazione di una fase apatitica simile a quella inorganica dell'osso per favorire la biomineralizzazione del materiale (PCL-HA), modificazione della superficie del materiale con oligopeptidi che favoriscano l'interazione con gli osteoblasti.

La caratterizzazione del composito PCL-PLLA ha messo in evidenza che la degradazione del materiale avviene preferenzialmente lungo le fibre del PLLA che fungono quindi da guida nella ricrescita tissutale. Inoltre si è evidenziato come alcuni tipi di cellule siano più attive di altre nella riorganizzazione del substrato fornito dallo scaffold.

Nel composito PCL-HA si è verificato che il rapporto in peso tra la componente polimerica e quella inorganica gioca un ruolo fondamentale sia nella degradazione (i campioni che contengono maggiore fase apatitica si degradano più lentamente) sia nello studio della cinetica di biomineralizzazione del materiale (anche in questo caso i campioni con maggiore fase apatitica mostrano la maggiore deposizione di calcio-fosfati).

Infine, la caratterizzazione degli oligopeptidi autoassemblanti ha permesso di chiarire in quali modi la sequenza degli aminoacidi possa influenzare le interazioni intra e intermolecolari che stanno alla base della formazione della struttura secondaria, permettendo di individuare quelli adatti per uno studio approfondito *in vitro* e *in vivo*.

Tra tutte le tecniche utilizzate, la spettroscopia vibrazionale Raman ha avuto un ruolo predominante, grazie alle sue caratteristiche di metodologia di analisi non distruttiva e non invasiva, che la rendono particolarmente adatta allo studio della degradazione dei materiali e alla caratterizzazione morfologica. Anche la tecnica micro-IR si è rivelata un ottimo strumento nell'analisi della struttura dei peptidi dopo deposizione su titanio: si tratta di uno dei primi lavori in letteratura (ad oggi) ad aver impiegato questa tecnica relativamente recente nel campo biomedico.